

Title	ペニシラミンの重金属解毒作用とそのキレート生成能との関連性に関する研究(Dissertation_全文)
Author(s)	杉浦, 幸雄
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1971-05-24
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r1803
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

主論文

ペニシラミンの重金属解毒作用とそのキ
レート生成能との関連性に関する研究

杉 浦 幸 雄

ペニシラミンの重金属解毒作用とそのキ
レート生成能との関連性に関する研究

杉 浦 幸 雄

目 次

緒 言	1
第一篇 ペニシラミンと各種重金属イオンとのキレート生成反応 に関する基礎的研究	4
第 1 章 ペニシラミンの酸解離と Co(II) , Ni(II) , Zn(II) , Cd(II) , Hg(II) および Pb(II) とのキレート生成反応	4
第 1 節 ペニシラミンの酸解離平衡	4
第 2 節 電位差滴定法によるペニシラミンならびにその関連化 合物と金属イオンとのキレート生成反応の検討	10
第 3 節 電子スペクトル法および核磁気共鳴法によるペニシラ ミンと金属イオンとのキレート生成反応の検討	21
第 4 節 ペニシラミンの重金属解毒効果とその金属キレートの 配位の形式との相関性に関する考察	29
第 2 章 ペニシラミンならびにその関連化合物と Cu(II) との酸 化還元・錯生成反応	31
第 1 節 ペニシラミンと Cu(II) との還元的キレート生成反応	32
第 2 節 ペニシラミン Cu(I, II) 混合原子価キレートの単離と構 造	39
第 3 節 ペニシラミン関連化合物の Cu(II) との錯生成能とその 尿中銅排泄効果との相関性に関する考察	42
第 3 章 ペニシラミンと他の SH 化合物とを含む混合配位子 Cd(II) , Hg(II) および Pb(II) キレートの生成反応	47

第 1 節	電位差滴定法による混合配位子キレートの生成反応の検討	47
第 2 節	混合配位子キレートの生成定数の測定	52
第 3 節	混合配位子キレートの生成機構	54
第 4 章	有害重金属の放射化学的微量定量へのペニシラミンの応用	59
第 1 節	ペニシラミンによる有機 Hg, Hg(II), Pb(II), Cd(II) および Ni(II) の放射滴定	59
第 2 節	ペーパークロマトグラフ分離による Hg(II) および有機 Hg の同位体希釈分析	68
第二篇	生体高分子結合重金属イオンとペニシラミンとの相互作用に関する研究	74
第 1 章	たんぱく結合 ^{203}Hg , ^{109}Cd および ^{65}Zn とキレート剤との相互作用	74
第 1 節	金属イオンの関数, キレート剤の関数およびたんぱく質の関数としての金属除去効果	75
第 2 節	金属除去率とキレートの生成定数との相関性	80
第 3 節	キレート剤によるたんぱく結合金属からの金属除去機構	83
第 2 章	S H 基含有キレート剤によるヘモグロビン結合有機 Hg および Hg(II) の除去反応	86
第 1 節	Hg 除去におよぼすキレート剤濃度および pH の影響	87
第 2 節	Hg 除去におよぼす種々の S H キレート剤の効果	91
第 3 節	Hg 除去率とキレート剤の S H 基の解離定数との相関性	94

第4節	Hg 除去の機構	96
第3章	ペニシラミンによるアルブミンCu(II) 錯体からの Cu 除去の機構と動力学	98
第1節	電子スペクトルによるペニシラミンとアルブミン Cu (II) 錯体との反応の検討	99
第2節	³ H- ペニシラミン, ⁶⁴ Cu を用いるゲルろ過法による三 重錯体の証明	102
第3節	吸収スペクトル法による Cu 除去に関する動力学的検 討	104
第4節	Cu 除去の機構	108
第4章	錯体化学を基礎とした新しい重金属解毒剤・放射性核 種除去剤の開発に関する考察	112
結 論		116
謝 辞		120
引用文献		121

ペニシラミンの重金属解毒作用とそのキ レート生成能との関連性に関する研究

緒 言

Hg, Pb, Cdなどの重金属が生物体内に侵入すると、酵素の機能を阻害したり、種々の代謝系の調節を乱したりして、生体に重大な障害をもたらすことはよく知られた事実であるが、従来、これら重金属による中毒は、特殊な職業病としての関心が払われていたにすぎなかった。しかるに近年、化学工業の急速な発達に伴って工場廃水、大気汚染あるいは農薬などの問題と関連して、これら重金属中毒が、社会毒ともいふべき公害として重大な問題を投げかけてきた。また、放射性同位元素が生体内に沈着すると、内部からの照射によって有害な影響を与えることは周知のことであるが、原子力時代とともに原子炉や放射性物質を取り扱う場所における事故、あるいは核実験による放射性降下物などにより、生体に放射性同位元素が侵入する機会が増加してきている。

このような背景のもとで、最近、キレート剤による有害金属の解毒・除去に関する研究の必要性が、急速に高まっている。従来、この分野の研究は、種々の金属イオンと安定度の高い、水溶性キレートを生成するアミノポリカルボン酸の出現によって大きく進展してきた。しかし、EDTAおよびDTPAを代表とするこの一群の化合物の共通の欠点として、体液中に多量存在するCaとの結合が高いこと、金属に対する選択性が少なくCa以外にも生体にとって必須な金属と反応する場合が多いこと、そしてその解毒効果は金属侵入直後には大きいのが、時間がたつと効果がないことなどが指摘されている。これに対して、含イオウキレート剤は、遷移金属や重金属と親和性が高く、Caとの親和性が低いのでこれら有害金属の解毒に対して大きな効果が期待

される。事実、多くの含イオウ、特にSH基含有キレート剤は、重金属に対して高い解毒能を示すようであるが、多くのSHキレート剤は、共通してアミノポリカルボン酸に比較して毒性が強く、実用面において強い制限を受ける。こうした中でペニシリンの分解産物であるペニシラミンは、SH化合物の中では毒性が極めて低く、また経口投与も可能であるところから、臨床医学方面で注目されている。しかもペニシラミンは、ある程度沈着した金属、すなわち慢性の中毒に対してもかなりの効果が期待され、興味をもたれている。またペニシラミンは、Hg, Pb, Auなどの重金属中毒の解毒剤としてばかりでなく、遺伝性のCuの代謝異常に基因していると考えられているウィルソン氏病の優れた治療剤としてもよく知られている。しかしながら、このようなペニシラミンの生物活性に対して詳細な物理化学的検討は、現在のところ全くなされていない。また錯体化学的にみてもペニシラミンは三種の配位基を有し、種々の金属に対し多様な配位形式をとり得るので興味をもたれるが、一般にイオウを配位原子とする錯体の研究は、酸素や窒素を配位原子とするその研究に比べてイオウ原子の配位原子としての特殊性の故に非常におくれており、特にペニシラミンのような複雑な配位子についてはほとんど研究されていない。

近年、一般に生体内での微量金属の役割に関連し、医薬品の作用への金属の関与の問題に対し錯体化学の役割が注目されつつある中で、ペニシラミンの重金属解毒作用とそのキレート生成能との間の関連性について、錯体化学の見地から系統的な検討を加え、ペニシラミンの生物活性に関与する化学反応や治療効果に貢献する物理化学的諸因子を明らかにするとともに、それらを基礎として錯体化学の立場から優れた重金属解毒剤の開発に関する考察を行なうことは、上記の背景から極めて有意義なことと考え本研究を計画した。このような観点から、まずペニシラミンのキレート生成反応の基礎的な事項として、ペニシラミンの酸解離平衡、ペニシラミン分子中の-SH基、-NH₂基および-COOH基と金属イオンとのキレート生成反応を明らかにし、さ

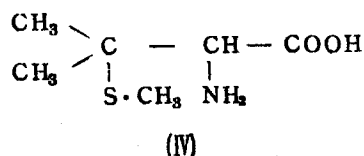
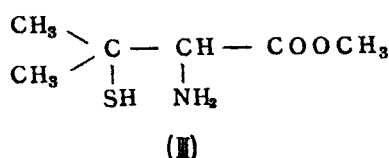
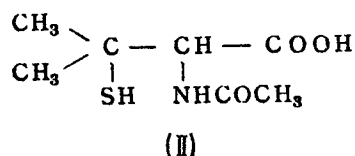
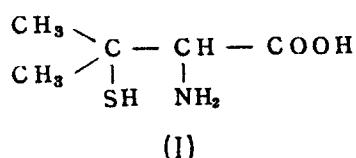
らに進んで、単純な系でのキレート生成反応のみならず、SH基を有することと基因する生体内での酸化還元反応への関与、生体内での他のキレート生成能を有する物質との競合反応の可能性などの点を重視し、Cu(II)との還元的キレート生成反応、混合配位子キレートの生成反応について詳しく検討を加えた。ついでこれら基礎的研究結果をもとにして、生体からの種々の金属の解毒・除去系のモデルとして、血清アルブミンやヘモグロビンのような生体高分子に結合した金属イオンとペニシラミンとの相互作用を平衡透析法やゲルろ過法などによって検討し、生体高分子からの金属イオンの除去機構や金属除去におよぼす物理化学的因子などについて追究を行ない、ペニシラミンがシステインなどの他のSH基を有するキレート剤と比較して錯体化学的にもかなり特徴的な性質を有することを見出し、その性質と優れた解毒効果とを関連づけることによりペニシラミンの優秀性を明らかにするとともに、錯体化学の立場からの重金属解毒剤開発に対する一考察を行なった。

以上の諸点について、詳細に論ずる。

第一篇 ペニシラミンと各種重金属イオンとのキレート生成 反応に関する基礎的研究

第1章 ペニシラミンの酸解離と Co (II) , Ni (II) , Zn (II) , Cd (II) , Hg (II) および Pb (II) とのキレート生成反 応

ペニシラミン (β , β - ジメチルシステイン, (I)) は, 分子内に S H 基, アミノ基およびカルボキシル基の三種の官能基を有する含イオウアミノ酸の一種であるが, ¹⁾ その生物活性発現にはこれら三種の官能基が主要な役割を演じていると予想される。特にペニシラミン自身の酸解離平衡やその金属キレートの配位の形式などは, ペニシラミンの重金属解毒作用に重要な影響を与えることが推定されるので, まずこれらの点について, N - アセチルペニシラミン(II), ペニシラミンメチルエステル(III)およびS - メチルペニシラミン(IV)のようなペニシラミン関連化合物と比較しながら, 電位差滴定法, 電子スペクトル法および核磁気共鳴法によって検討をおこなった。



第1節 ペニシラミンの酸解離平衡

水溶液中でのキレート剤 (配位子) と金属イオンとの反応を検討する際,

配位子自身の酸解離平衡に関する知見を得ることは、反応性や反応機構を理解する上で、また次節で述べるような水素イオンと金属イオンとの競争反応によって生成キレートの生成定数を測定する場合には極めて重要である。この節では、まずペニシラミンのマクロな酸解離定数を電位差滴定法で求め、ついでS H基とNH₃⁺基とが独立、対等に解離するのではなく、相互作用をおよぼし合った解離平衡を考えることによってミクロな酸解離定数を求めた点について論ずる。

実験方法

試薬：DL-ペニシラミンは、シグマ社の製品を用いた。ペニシラミンメチルエステルの塩酸塩は、無水メタノール中でペニシラミンと乾燥塩酸ガスとを作用させることによって合成し、メタノール-エーテルから再結晶した。²⁾N-アセチルペニシラミンは、ペニシラミンを当量の水酸化ナトリウムに溶解し、冷却下無水酢酸と処理することによって合成し、水から再結晶した。³⁾またS-メチルペニシラミンは、ペニシラミンとヨウ化メチルとの反応で合成した。⁴⁾炭酸不含の水酸化カリウム溶液は、Armstrong によって推奨されている方法⁵⁾に従って調製し、ついでこれをフタル酸水素カリウムで標定して使用した。

装置と操作：滴定容器に1.0 Mの硝酸カリウム溶液5 ml および 2.0×10^{-2} M配位子溶液10 mlを加え、ついで蒸留水を加えて全量を50 mlに調節する。滴定は、温度 $22 \pm 0.1^\circ$ の条件下窒素気流中で0.1 N炭酸不含の水酸化カリウム溶液で行なった。0.01 mlまで測定できる10 mlのメトローム社製シリンジビュレットを用い、またpHの測定にはメトローム社製pHメーターE300-B型を使用した。

計算法：一般に酸HAの酸解離定数 K_a は、次式によって示される。

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \dots\dots\dots (1)$$

ここで、[HA]は解離していない酸の濃度、[A⁻]は解離した酸の濃度、

そして $[H^+]$ は水素イオン濃度である。

もしも水素イオン濃度としてpHメーターの読みをそのまま換算して用いるならば、 $[H^+]$ のかわりに水素イオンの活量 $\{H^+\}$ を用いた混合定数 K_a' が得られる。

$$K_a' = \frac{[A^-]\{H^+\}}{[HA]} \quad (2)$$

しかしながら、溶液の濃度が0.01 M以下であるときには K_a （濃度定数と呼ばれる）と K_a' との差は小さく、また±0.02 pH程度の精度のpHメーターを使用する測定では無視しうるので、本研究では混合定数 K_a' を採用した。（以降、 K_a' を単に K_a と記して用いる）。

配位子のマクロな酸解離定数の計算に対しては、(2)式から誘導される(3)式を用いた。

$$pK_a = pH + \log \frac{C - [KOH] - \{H^+\} + \{OH^-\}}{[KOH] + \{H^+\} - \{OH^-\}} \quad (3)$$

ここで、 C は配位子の全濃度、 $[KOH]$ は加えられた水酸化カリウムの濃度、 $\{H^+\}$ はpHメーターの読みから換算された水素イオンの活量、また $\{OH^-\}$ は水のイオン積 K_w (0.796×10^{-14}) から計算された水酸イオンの活量である。

結果と考察

各配位子に対して得られた滴定曲線をFig. 1に示す。ペニシラミンおよびS-メチルペニシラミンのような一種のアミノ酸では水溶液中において zwitter ion として存在するため、COOH基はすでに COO^- として解離して存在している。従って、前者では2個（SH基と NH_3^+ 基）の、また後者では1個（ NH_3^+ 基）の解離定数が得られる。

各配位子の酸解離定数を(3)式より計算したが、この際 C および $[KOH]$ については容積変化に伴う補正を行なった。計算の一例をペニシラミンについてTable Iに、また計算結果をTable IIに示した。

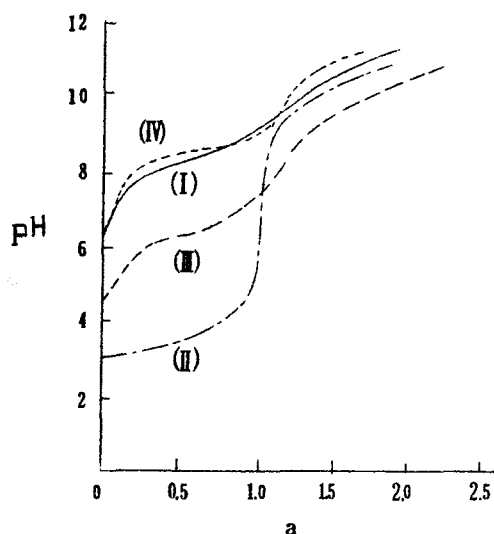


Fig.1. Potentiometric Titrations of Penicillamine (I),
N-Acetylpenicillamine (II), Penicillamine methyl
ester (III) and S-Methylpenicillamine (IV).
a: moles of base per ligand

アルカリによるペニシラミンの直接の pH 滴定は、2つの“macroscopic”
pK 値、すなわち、 $pK_2 = 8.09$ および $pK_3 = 10.55$ を与える。メルカプ
タン類における研究で脂肪族チオール基の pK は約 10.5 程度であること
が知られており、⁶⁾ ペニシラミンの場合の pK_3 はこの値に近く、一応 SH 基
の解離に帰属させてもよいように思われるが、三種の異なった官能基をも
った化合物の酸解離平衡を厳密に論ずる場合にはこれでは不十分である。
特に、 NH_3^+ 基と SH 基との解離は近接しオーバーラップしていると推定
され、従って Fig. 2 のような解離平衡が考えられる。この平衡系における
“microscopic” 定数、すなわち K_{12} , K_{13} , K_{123} および K_{132} は、“ma-
croscopic” 定数と次式のように関係づけられ、そして“microscopic”
定数は、式(4)、(5)および(6)によって計算される。

Table I. Calculations of the Acid Dissociation Constants of DL-Penicillamine
($\mu=0.1$ (KNO₃), $t=22\pm0.1^\circ$)

0.1NKOH (ml)	pH	[HA]	[A ⁻]	$\frac{[HA]+[OH^-]}{[A^-]-[OH^-]}$	前欄の対数	pK _a
0	5.44					
0.2	7.16	0.00356	0.00044	8.09	0.91	8.07
0.4	7.53	0.00313	0.00087	3.60	0.56	8.09
0.6	7.78	0.00270	0.00130	2.08	0.32	8.10
0.8	7.98	0.00227	0.00173	1.31	0.12	8.10
1.0	8.17	0.00184	0.00216	0.852	-0.07	8.10
1.2	8.37	0.00142	0.00258	0.550	-0.26	8.11
1.4	8.60	0.00100	0.00300	0.333	-0.48	8.12
1.6	8.88					
1.8	9.31					
2.0	9.70	0.00345	0.00055	7.16	0.85	10.55
2.2	10.01	0.00302	0.00098	3.49	0.54	10.55
2.4	10.23	0.00259	0.00141	2.17	0.34	10.57
2.6	10.39	0.00216	0.00184	1.48	0.17	10.56
2.8	10.52	0.00174	0.00226	1.04	0.02	10.54
3.0	10.64	0.00132	0.00268	0.763	-0.12	10.52
3.2	10.75	0.00090	0.00310	0.600	-0.22	10.53
3.4	10.85					

$pK_2=8.09\pm0.03$, $pK_3=10.55\pm0.03$

Table II. Acid Dissociation Constants of Penicillamine and Its Derivatives

	pK ₁	pK ₂	pK ₃
Penicillamine	<2.5	8.09±0.03	10.55±0.03
S-Methylpenicillamine	<2.5	8.48±0.06	—
Penicillamine methyl ester	—	6.30±0.04	9.17±0.03
N-Acetylpenicillamine	3.28±0.02	—	10.26±0.02

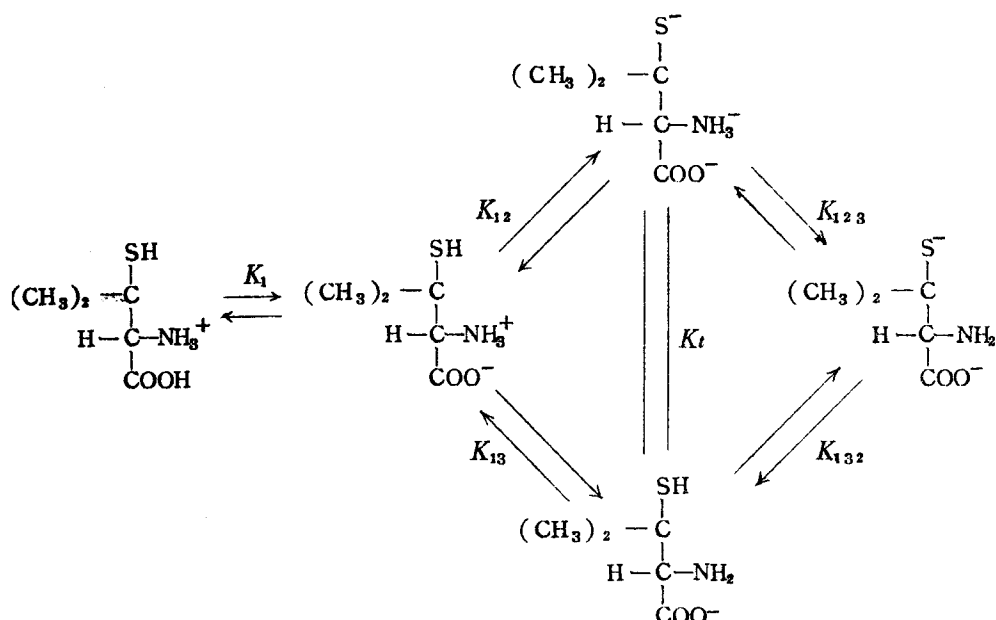


Fig.2. Scheme of Ionization Equilibrium of Penicillamine

$$K_2 = K_{12} + K_{13} \quad (4)$$

$$1/K_3 = 1/K_{123} + 1/K_{132} \quad (5)$$

$$K_t = K_{12}/K_{13} = K_{132}/K_{123} \quad (6)$$

この際、直接の滴定によってこれら四つのマイクロ定数のいずれかを求めることは困難なので、ペニシラミンのメルカプト基のメチル化はその NH_3^+ 基の塩基性に対して大きな影響を与えないであろうという仮定のもとに、S-メチルペニシラミンの NH_3^+ 基のプロトン解離に対して測定された値を便宜上 K_{13} として使用した。得られたペニシラミンのマイクロ解離定数の値を Table I に示したが、Wrathall らによって測定されたシステインの場合のそれとよく対応しており、また S H 基よりも NH_3^+ 基の方が幾分塩基性が大であることを示している。さらに、ペニシラミンメチルエステル

のSH基および NH_3^+ 基のpK値は、ペニシラミンのそれと比較してかなり低下しているが、この酸強化効果(acid-strengthening effect)は、カルボン酸のメチルエステル化による負の感応効果(-I効果)に由来していると考えられる。そしてこのpK値の低下が、次節で詳述するところであるが、同じ NH_2 基と S^- 基とが関与したキレート化合物においても、ペニシラミンメチルエステルキレートの方がペニシラミンキレートよりも生成定数が小さくなっている原因となっている。

Table III. Micro Acid Dissociation Constants of Penicillamine

	$\text{p}K_{12}$	$\text{p}K_{13}$	$\text{p}K_{123}$	$\text{p}K_{132}$	K_t
Penicillamine	8.32	8.48	10.31	10.17	1.4
Cysteine ⁷⁾	8.58	8.63	10.32	10.25	1.2

第2節 電位差滴定法によるペニシラミンならびにその関連化合物と金属イオンとのキレート生成反応の検討

ペニシラミンは、その分子内にSH基、 NH_2 基および COOH 基三種の配位基を有し、遷移金属や重金属イオンと安定なキレート化合物を形成することができる。すなわち、 NH_2 基はその窒素原子の lone pair によって、またSH基と COOH 基とは各々 S^- および COO^- に解離することによって共有性の electrovalent 結合を形成しうる。それ故、ペニシラミンと金属イオンとのキレート生成における配位の形式は、次の四種のタイプに分類することができる。

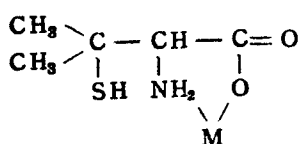
- (a) グリシンのように、金属は -NH_2 と -COO^- とで結合する。(N-O配位型)
- (b) チオグリコール酸のように、金属は -S^- と -COO^- とで結合する。

(S - O 配位型)

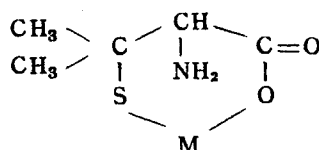
(c) メルカプトエチルアミンのように、金属は $-S^-$ と $-NH_2$ とで結合する。(S - N 配位型)

(d) 金属が三種の配位基 ($-S^-$, $-NH_2$, $-COO^-$) とで結合する。

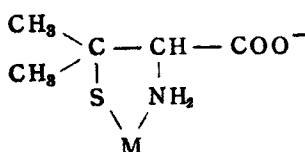
(S - N - O 配位型)



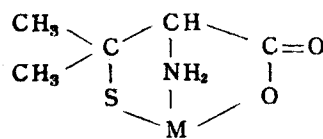
(a)



(b)



(c)



(d)

反応する金属イオン，反応種の濃度あるいは pH などの反応環境によって，生成するキレートの配位の形式に相異が予想される。またペニシラミンのキレート生成能を詳細かつ定量的に知るためには，その金属キレートの安定度に関する知識が必要である。そこで本節ではこの点を明らかにするため，ペニシラミンの他に N - アセチルペニシラミンおよびペニシラミンメチルエステルの金属キレート化合物の生成定数を電位差滴定法によって求め，そして既知のバリンキレートの生成定数⁸⁾を加えて，これら S - O タイプ，S - N タイプおよび N - O タイプのモデル化合物の安定度とペニシラミンキレートの安定度との比較検討を行なった。また，ペニシラミンの

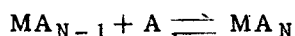
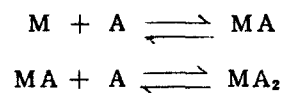
光学活性体によるキレート生成能の差違についてもあわせて検討を加えた。

実験方法

試薬：DL-ペニシラミン，N-アセチルペニシラミン，ペニシラミンメチルエステルおよび0.1 N水酸化カリウム溶液は，前節で記述したものをを用いた。L-ペニシラミン塩酸塩は，シグマ社の製品を使用した。また0.1 M金属標準溶液は，試薬特級の各金属塩を脱塩水に溶解し，0.1 M EDTA標準溶液で標定して使用した。

装置と操作：電位差滴定法は，前節で述べた pK_a 測定の場合と本質的に同じである。滴定容器に1.0 M硝酸カリウム溶液 5 ml，0.1 M金属標準溶液 1 ml および 2.0×10^{-2} M配位子溶液 10 mlを添加し，ついで蒸留水で全量を 50 mlにしたのち， $22 \pm 0.1^\circ$ で窒素ガスを通じながら炭酸不含の0.1 N水酸化カリウム標準溶液で標定した。pHの測定は，前節と同様の方法で行なった。

生成定数の計算法：キレート化合物の生成定数の計算は，Bjerrum 法により \bar{n} （金属1個当りに結合する配位子の平均分子数）と $[A]$ （遊離配位子の濃度）との関係から生成曲線を求め，ついで逐次近似法によって行⁹⁾なった。一般に，中心金属イオンMとN個の配位子分子Aとのキレート生成反応は，次のように表わされる。



これらの生成定数は，次式で表わされる。

$$\left. \begin{aligned} k_1 &= \frac{[MA]}{[M][A]} \\ k_2 &= \frac{[MA_2]}{[MA][A]} \end{aligned} \right\} \dots\dots\dots (7)$$

$$k_N = \frac{[MA_N]}{[MA_{N-1}][A]} \quad \left. \vphantom{\frac{[MA_N]}{[MA_{N-1}][A]}} \right\}$$

$$K = k_1 k_2 \dots k_N = \frac{[MA_N]}{[M][A]^N} \quad \dots\dots\dots (8)$$

ここで、金属 1 個当りに結合する配位子の平均数を \bar{n} とすれば、

$$\bar{n} = \frac{[MA] + 2[MA_2] + \dots\dots\dots + N[MA_N]}{[M] + [MA] + [MA_2] + \dots\dots\dots + [MA_N]} \quad \dots\dots\dots (9)$$

この式の分子は金属イオンに結合している配位子の全濃度を、また分母は金属成分の全濃度を示している。式(9)の $[MA]$ 、 $[MA_2]$ などへ式(7)の $[MA]$ 、 $[MA_2]$ などを代入し、 $[M]$ を消去すれば、

$$\bar{n} = \frac{k_1[A] + 2k_1k_2[A]^2 + \dots\dots\dots + Nk_1k_2\dots k_N[A]^N}{1 + k_1[A] + k_1k_2[A]^2 + \dots\dots\dots + k_1k_2\dots k_N[A]^N} \quad \dots\dots\dots (10)$$

すなわち \bar{n} は、溶液中に遊離の状態で存在している配位子濃度 $[A]$ と生成定数 k_1 、 k_2 、 $\dots\dots\dots$ 、 k_N の関数となる。従って、 N 個の方程式が得られれば N 個の生成定数を計算することが可能であるが、実際には \bar{n} と $-\log[A]$ すなわち pA との関係から生成曲線を描いて曲線上から求める場合が多い。この計算のための \bar{n} および $[A]$ は、 $N=2$ の場合には次式で与えられる。

$$[A] = \frac{C - [KOH] - \{H^+\} + \{OH^-\}}{P} \quad \dots\dots\dots (11)$$

$$\bar{n} = \frac{C - Q[A]}{[M]} \quad \dots\dots\dots (12)$$

$$\text{ただし、 } P = \frac{\{H^+\}}{K_a} + \frac{2\{H^+\}^2}{K_a K'_a}$$

$$Q = \frac{\{H^+\}}{K_a} + \frac{\{H^+\}^2}{K_a K_a'} + 1$$

ここで、 K_a および K_a' は配位子の酸解離定数で、 K_a は高い方の定数に相当する。

ペニシラミン、N-アセチルペニシラミンおよびペニシラミンメチルエステルと種々の金属イオンとのキレート生成に対しては、(11)および(12)式から生成曲線を求め生成曲線上の $\bar{n} = 0.5$ と $\bar{n} = 1.5$ の時の pA 値を逐次生成定数 k_1 , k_2 の一次近似値として求めた。ついでこれを Bjerrum の逐次近似法によって計算をくり返し、最終的な生成定数を算出した。なお、水銀キレートの生成定数はキレート化合物が非常に安定なため、上記のような方法では正確な値を求めることは出来なかったので、Cheberek と Martell の代数法¹⁰⁾によって概略値を算出した。

結果と考察

実験によって得られた滴定曲線を Figs. 3, 4, 5, 6 および 7 に、また式(11)と(12)とから計算された \bar{n} と pA の関係より得られた生成曲線を Figs. 8, 9 および 10 に示した。

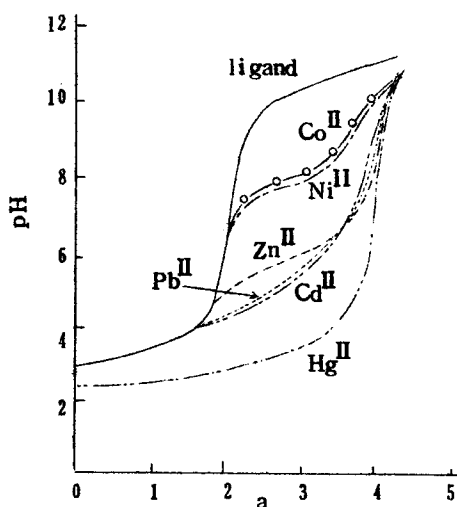


Fig. 3. Titration Curves of N-Acetylpenicillamine with Metals; Ligand ($4.0 \times 10^{-3} M$) to Metal Ratio = 2:1
a: moles of base per metal

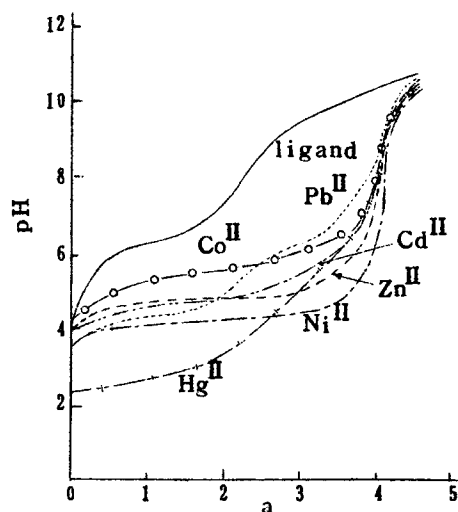


Fig. 4. Titration Curves of DL-Penicillamine Methyl Ester Hydrochloride with Metals; Ligand ($4.0 \times 10^{-3} M$) to Metal Ratio = 2:1

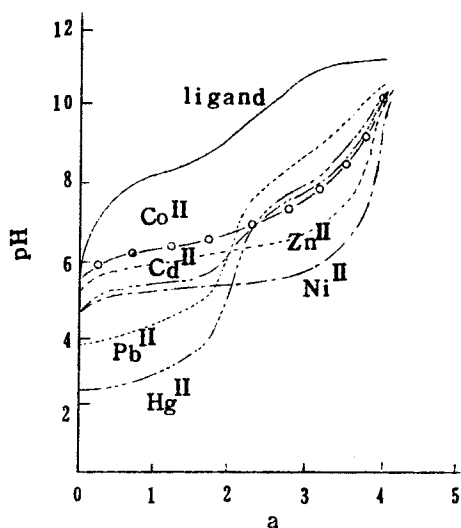


Fig.5. Titration Curves of DL-Penicillamine with Metals; Ligand (4.0×10^{-3} M) to Metal Ratio=2:1

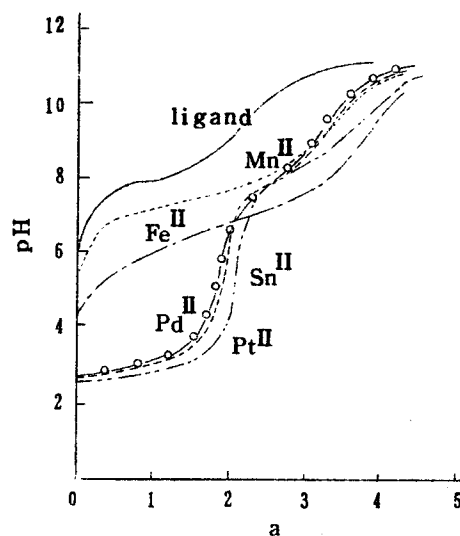


Fig.6. Titration Curves of DL-Penicillamine with Metals; Ligand (4.0×10^{-3} M) to Metal Ratio=2:1

a: moles of base per metal

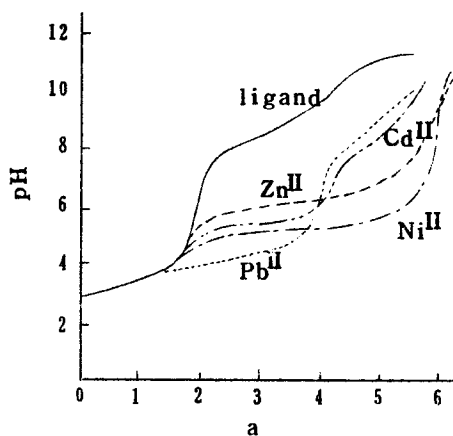


Fig.7. Titration Curves of L-Penicillamine Hydrochloride with Metals; Ligand (4.0×10^{-3} M) to Metal Ratio=2:1

a: moles of base per metal

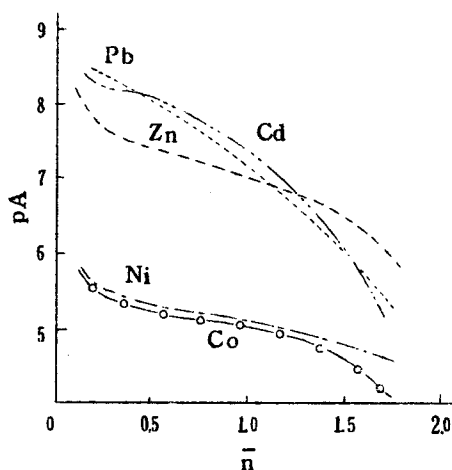


Fig.8. Formation Curves of N-Acetylpenicillamine with Metals

\bar{n} : average number of ligands bound per metal

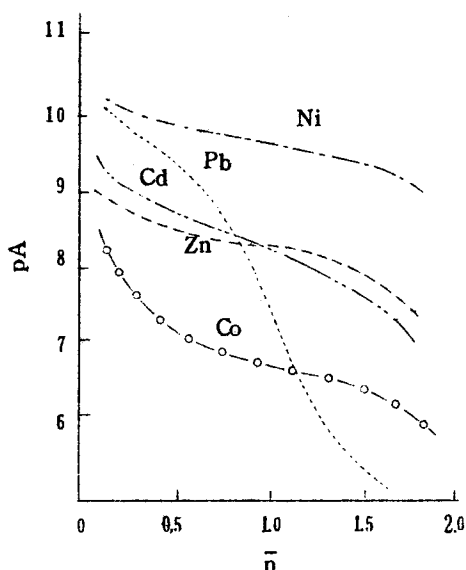


Fig. 9. Formation Curves of Penicillamine Methyl Ester with Metals

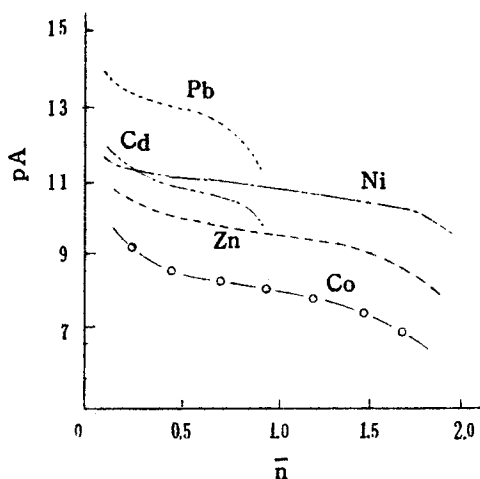


Fig. 10. Formation Curves of DL-Penicillamine with Metals

\bar{n} : average number of ligands bound per metal

モル比でペニシラミン：金属＝2：1の滴定曲線 (Figs. 5, 6, 7) は、 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} そして Zn^{2+} のような金属イオンにおいては $a = 4$ で明確な pH ジャンプを与えており、このことは2対1キレート化合物の生成を示唆している。一方、 Pd^{2+} , Sn^{2+} , Pt^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} そして Pb^{2+} のような金属イオンにおいては $a = 2$ で鋭い pH inflection を示し、またこれら金属イオンの場合、配位子：金属＝1：1の条件下の滴定曲線は、やはり $a = 2$ で pH ジャンプを与える。このことは、これらの金属イオンとは1対1のキレート化合物を形成することを示している。上記の事実は、 Co^{2+} , Ni^{2+} および Zn^{2+} のような金属イオンとペニシラミンとから導かれるキレート化合物では、ペニシラミンは二座配位子として作用し、一方、 Cd^{2+} , Hg^{2+} および Pb^{2+} のような金属イオンとペニシラミンとの反応で生成するキレート化合物では、ペニシラミンは三座配位子として作用するという考えが最も妥当であることを示唆しているであ

ろう。

電位差滴定法によって最終的に算出されたペニシラミンおよびその関連化合物のキレート化合物の生成定数を Table IV に示した。

Table IV. Stability Constants of Divalent Metal Chelates of Penicillamine and Its Derivatives

Metal	Ligand	Valine ⁸⁾	N-Acetyl- penicillamine	Penicillamine methyl ester	DL-Penicill- amine	D-Penicill- amine ¹¹⁾	L-Penicill- amine
Co ^{II}	log k_1	4.57	5.60	7.09	8.38	9.04	
	log k_2	3.67	4.59	6.76	7.71	8.08	
Ni ^{II}	log k_1	5.37	5.65	9.95	11.20	11.17	11.62
	log k_2	4.16	4.93	9.40	10.68	12.08	11.04
Zn ^{II}	log k_1	5.00	7.61	8.82	9.95	10.16	10.12
	log k_2	4.10	6.54	8.08	9.12	9.53	9.07
Cd ^{II}	log k_1			9.09	10.92		10.96
	log k_2		a	7.33			
Pb ^{II}	log k_1			9.41	12.88	13.48	13.18
	log k_2		a	5.82		3.88	
Hg ^{II}	log k_1			14.2	16.4		
	log k_2						

a: The value cannot be accurately calculated as the formation curve is unsymmetrical.

これを見てみると一般にその安定度の順序は、Valine < N-Acetylpenicillamine < Penicillamine methyl ester < Penicillamine の順に増大している。ペニシラミンキレートの生成定数は、N-O 配位のバリリンや S-O 配位の N-アセチルペニシラミンよりも S-N 配位のペニシラミンメチルエ

ステルのそれに近く、ペニシラミンキレートにおいては $-S^-$ 基と $-NH_2$ 基の寄与が支配的であることを暗示している。ペニシラミンメチルエステルキレートの生成定数はペニシラミンキレートのそれよりも幾分小さな値を示しているが、この理由は前節で指摘したようにペニシラミンメチルエステルの pK_a が、ペニシラミンの pK_a に比較して低いことから容易に説明できる。すなわち、ペニシラミンメチルエステルにおけるチオール基およびアミノ基の塩基性の低下は、キレート生成において金属イオンと電子対を共有する傾向の低下を示しており、この結果ペニシラミンメチルエステルキレートの生成定数が、ペニシラミンキレートのそれよりも幾分小さくなっていると考えられる。ペニシラミンキレートとペニシラミンメチルエステルキレートとの生成定数の差を各金属イオンについてプロットしてみると、Fig. 11のような結果が得られた。 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Zn^{2+} においては、その差はlog単位で約1.3であり、この差は前述の官能基の塩基性の低下に起因していると解釈される。しかしながら、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Pb^{2+} のような金属イオンの場合には、それぞれlog単位で1.8、2.2および3.5と前者の金属グループの場合よりも大きな差が観測される。

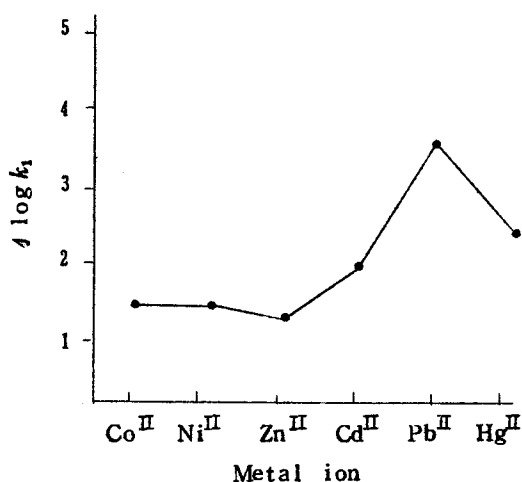
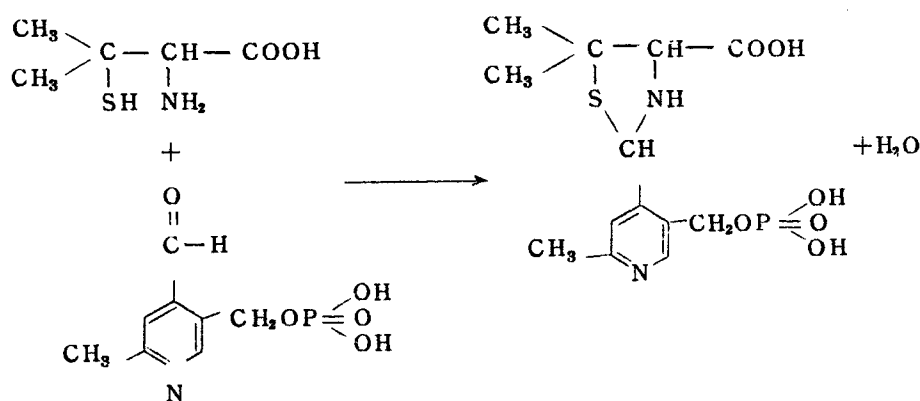


Fig. 11. Differences in Stability Constants between Penicillamine Chelates and Penicillamine Methyl Ester Chelates

この現象は、 Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} の場合とちがって、 Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} の場合にはペニシラミン分子中の $-\text{S}^-$ 基と $-\text{NH}_2$ 基とからの配位の他に、 $-\text{COO}^-$ 基からの弱い配位が関与しているためであろうと推定され、このことは前述の滴定曲線から示唆された結果によく対応している。実際分子モデルからも比較的大きな金属イオンに対しては、ペニシラミンが三座配位子として作用しても分子の歪みは小さく、三座配位 1 対 1 キレートは立体的にも十分可能な構造であることがわかる。従来、Li と Manning は、システインの亜鉛キレートの生成定数を測定し、グリシン、チオグリコール酸およびメルカプトエチルアミン各亜鉛キレートのそれとの比較検討より、システイン亜鉛キレートにおいてはシステイン分子中のチオール基とアミノ基とが独占的に配位に関与していることを示した。¹²⁾ 本節での電位差滴定法による検討の結果、ペニシラミンは Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} のような金属イオンとは、その分子中の $-\text{S}^-$ 基と $-\text{NH}_2$ 基とで配位した 2 対 1 のキレートを生成し、この場合 COO^- 基はほとんど配位に関与していないと推定される。一方、ペニシラミンは Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} のような金属イオンに対しては、 $-\text{S}^-$ 基と $-\text{NH}_2$ 基の他に COO^- 基の弱い配位が関与した 1 対 1 のキレートを生成すると考えられる。そしてペニシラミン分子中のカルボキシル基からの配位の強さは、 $\text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ の順に減少することが Fig. 11 から推察される。ペニシラミンと他の SH 化合物とがともに関与した混合配位子キレートの生成反応にこの序列が大きく関連しているのは極めて興味深いことであるが、それについては第 3 章で詳述する。さらに、 Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} および Pb^{2+} の六種の 2 価カチオン類において、その結晶イオン半径は、それぞれ 0.78 , 0.78 , 0.74 , 0.97 , 1.10 および 1.20 Å であることはよく知られているが、この金属イオン半径と Fig. 11 における生成定数の差 (Δ) との間に顕著な相関性が認められることは、 Cd^{2+} , Hg^{2+} および Pb^{2+} とペニシラミン分子中のカルボキシル基との間の静電的相互作用を強く推察させるものである。

また遷移金属キレートの安定度の一般的な序列においては $\text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ であるが、S-O配位型のチオグリコール酸や β -メルカプトプロピオン酸においては $\text{Ni}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$ と順序が逆転している。同じメルカプトカルボン酸に属するN-アセチルペニシラミンにおいてもやはり $\text{Ni}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$ という順序になっており、これもまた興味ある現象である。

ペニシラミンの光学活性体によってその重金属解毒効果に大きな差が認められているが、¹³⁾ Table IVに見られるように光学活性体によるキレート生成能には大きな相異は見られない。L-ペニシラミンに解毒効果が認められないということは、L-ペニシラミンのキレート生成能からは説明できないが、この現象は、おそらく生体内においてL-ペニシラミンがピロドキサル-5-燐酸(ビタミンB₆)と容易に反応して次のようなthiazolidine¹⁴⁾環を形成するため、その重金属解毒作用が失われるものと考えられる。



なお、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および Sr^{2+} のようなアルカリ土類金属とペニシラミンとの錯生成反応を電位差滴定法によって検討したところ、その滴定曲線は、配位子単独のそれとほとんど同じであり本法によって定量的に考察することは困難であった。アルカリ土類金属は、生体内において多量に存在し、そして体液のpH調節や種々の酵素反応の助酵素的役割をはたしている。それ故、一般に薬物の効果を考える場合これらアルカリ土類金属、と

りわけ Ca^{2+} および Mg^{2+} と薬物との相互作用は無視できない点であるが、これら金属イオンとペニシラミンとの錯生成が極めて弱いということは、ペニシラミンの重金属解毒作用にとって極めて有利であることは明らかである。

第3節 電子スペクトル法および核磁気共鳴法によるペニシラミンと金属イオンとのキレート生成反応の検討

一般に d-d 遷移吸収帯、電荷移動吸収帯あるいは配位子固有の吸収帯など電子のエネルギー準位間の遷移を反映している電子スペクトル（紫外可視吸収スペクトル）の測定は、溶液中の錯体の構造や錯体における配位子-金属結合の性質などについて重要な知見を与えるものと期待される。前節において、金属イオンの種類によってペニシラミンの配位の形式に相異があることを指摘したが、本節ではこの点をさらに考察するため、S-N型配位が優位であると考えられるNiキレートおよびS-N-O型配位が優位であると考えられるPbキレートについて電子スペクトルを測定し、種々モデル化合物との比較から検討を加えた。また種々の含イオウ配位子のPbキレートに関して、その吸収極大波長とキレートの安定度との間の相関性を追究し、興味深い知見を得た。

さらに、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Pb^{2+} とペニシラミンとのキレート生成反応、特にこれら金属イオンに対するペニシラミン分子中のカルボキシル基の配位の関与をより直接的に証明するため、ペニシラミン分子中のメチンプロトンの化学シフトを指標とした核磁気共鳴法（NMR法）の応用を試みた。従来、酸解離平衡についてNMR法によって電位差法とよく対応する結果が得られているが、一般にNMR法によればシグナルの位置、その形状、幅あるいは微細構造を精密に解析することによって、溶存錯体の性質や構造などを具体的に解明できる場合があり、NMR法の水溶液中での錯体の

研究への応用は極めて興味ある課題であると考えられる。

実験方法

電子スペクトルの測定は、 $\text{pH } 6 \sim 12$ の水溶液中において日立製自記分光光度計 EPS-2 型を用いて行なった。 pH の調節には、ホウ砂緩衝液を使用した。

NMR スペクトルは、バリアン社製 A-60 スペクトロメーター (60Mc) によって測定した。ペニシラミンおよびその Hg(II) , Pb(II) , Cd(II) , Zn(II) , Ni(II) 各キレート化合物をそれぞれ 0.1 M 水溶液とし、2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) を内部標準として測定した。溶液の pH は、0.1 N 塩酸および 0.1 N 水酸化ナトリウムによって調節した。

また、 pH の測定にはメトローム社製 pH メーター E300-B 型を用いた。

結果と考察

ペニシラミン Ni キレートは、弱酸性からアルカリ性にかけて橙色を呈し、その吸収スペクトルは、波長 $270 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4.1$) および $467 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 2.1$) に明確な吸収極大を示す。吸収位置並びに吸収強度から考えて短波長側の吸収は電荷移動吸収帯に、そして長波長側の吸収は $d-d$ 遷移吸収帯に帰属されるであろう。また、ペニシラミン Pb キレートの吸収スペクトルは、波長 $268 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3.6$) に電荷移動吸収帯と考えられる吸収を有する。前節の電位差滴定法による検討から、ペニシラミン Ni キレートは S-N 配位型の 2 対 1 キレートを、そして Pb キレートは S-N-O 配位型の 1 対 1 キレートを生成することが推定されたが、電子吸収スペクトルの立場からこの点についてさらに検討を加えた。すなわち、電子スペクトルの吸収位置や吸収強度は、錯体の電子項の遷移をあらわしており、これを解析すれば錯体の構造、結合の強さ、荷電分布などに関する知見が得られる。たとえば $d-d$ 吸収帯は、一般に可視部にあらわれる

弱い吸収帯で金属原子の d レベル間の遷移によるものであり、そして各金属イオンに特有の吸収であるため、そのまわりの立体構造によって異なり、同じ立体構造の場合には配位子の種類によってわずかにシフトすることが知られている。また電荷移動吸収帯は、金属—配位子間の荷電の移動を伴う吸収で可視または紫外部に強くあるいは中程度にあらわれ、その電子移動の方向や大きさは金属と配位子との相対的な性質できまらるであろう。このような観点から、配位の形式を異にする種々のモデル化合物を合成し、これら配位子と Ni および Pb とのキレート化合物の吸収スペクトルを測定し、その吸収帯の位置と吸収強度（分子吸光係数）とを求め、ペニシラミンキレートのそれと比較検討することを計画した。得られた結果を Table V に示した。

Table V. Spectral Data for Nickel and Lead Chelates

Ligand	Nickel chelate		Lead chelate	
	Absorption max($m\mu$)	Extinction coefficient ($\times 10^2$)	Absorption max($m\mu$)	Extinction coefficient (10^3)
Penicillamine	467	1.3	268	4.4
Cysteine	467	1.3	267	4.1
β -Methyl- β -ethylcysteine	467	1.4	268	4.5
Valine	—	—	—	—
S-Methylpenicillamine	—	—	—	—
N-Acetylpenicillamine	518	2.9	313	3.9
N-Acetyl- β -methyl- β -ethylcysteine	520	2.9	311	4.0
β -Mercaptoisovaleric acid	520	3.1	313	4.1
2-Mercaptoethylamine	470	1.1	301	4.0
Cysteine methyl ester	468	1.2	300	3.7
Penicillamine methyl ester	468	1.3	302	4.0

Table V から明らかなように、Ni キレートの場合 N-O 配位型のバリンや S-メチルペニシラミンでは吸収を示さないが、N-アセチルペニシラミンや β -メルカプトイソ吉草酸のような S-O 型配位子は、 $520\text{m}\mu$ 付近に吸収極大を有する桃色キレートを生成する。2-メルカプトエチルアミンやペニシラミンメチルエステルのような S-N 型配位子では、 $470\text{m}\mu$ 付近に吸収をもつ橙色キレートを生成し、その分子吸光係数は S-O 型キレートのその約 $\frac{1}{2}$ である。このように S-N 配位型キレートは、S-O 配位型キレートに比べて $50\text{m}\mu$ 程度極大位置が青色遷移 (blue shift) しているのが観察される。そして当のペニシラミン Ni キレートは、吸収帯の位置ならびに分子吸光係数ともに S-N タイプのそれと全く一致し、電子スペクトルの見地からも S-N 配位型キレートが優位であることを示している。一方、Pb キレートの場合には N-O 型配位子では吸収を持たず、S-O 型のものでは $310\text{m}\mu$ 付近に吸収を示し、また S-N 型のものでは $300\text{m}\mu$ 付近に吸収極大を有する。ところが、Ni の場合とは異なってペニシラミンやシステインではさらに短短長にシフトして $270\text{m}\mu$ 付近に吸収を示す。この事実は、ペニシラミン Pb キレートにおいては、やはりカルボキシル基が関与した S-N-O 配位型キレートが優位であることを暗示していると考えられる。

さらに、ペニシラミン Ni および Pb キレートの組成を連続変化法とモル比法とによって pH 8.5 の条件下、それぞれ $467\text{m}\mu$ および $268\text{m}\mu$ を用いて検討した結果、Ni キレートでは配位子：金属 = 2 : 1、そして Pb キレートでは配位子：金属 = 1 : 1 であることがわかった。この事実からも、上述した結論の妥当性が支持されるであろう。

なお、ペニシラミンおよびその関連化合物の Pb キレートに関して、その吸収極大波長と生成定数との間の関係をプロットしてみると、Fig. 12 のようなよい相関性が認められた。

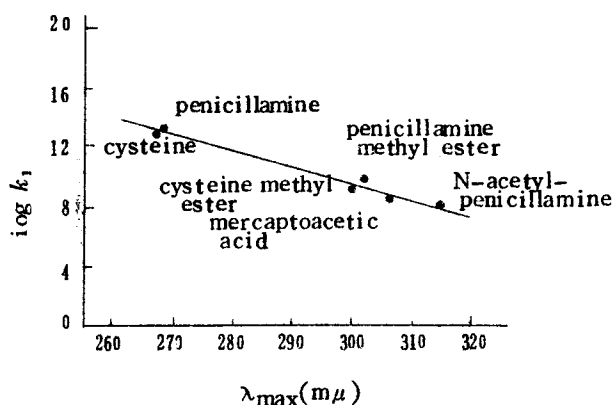


Fig. 12. Correlation of Stability Constants to Wavelengths of Absorption Maximum in Lead Chelates

従来、電子スペクトルの吸収帯の位置と配位結合の強さとの間を関係づける試みは、アセチルアセトンの2価金属キレートにおいてなされ、この場合 $\pi-\pi$ 吸収帯のシフトの大きさが安定度の順序と一致することが認められているが¹⁵⁾、このような経験的に吸収帯の位置と安定度との間に平行関係が観察される場合は少なく、特にイオウと鉛との相互作用について全く検討されていない現状では極めて有用な知見であると思われる。

つぎにペニシラミンNiキレートの構造に対して、その電子スペクトルより考察を行なった。一般的に、常磁性のNi(II)錯体は緑～青色で、反磁性のそれは黄～赤褐色を呈する。前者は、(1)正四面体(sp^3 混成)、(2)平面正方形(dsp^2 または sp^2d 混成)、(3)正八面体(d^2sp^3 混成)型のいずれの構造の場合もスピンだけについての値は2.83 B.M. となって磁氣的に区別できないが、後者は、平面正方形構造(dsp^2 混成)をとることはよく知られている。しかしながらNi錯体の場合は、磁氣的性質を待つまでもなくその吸収スペクトルからもっとも断定的に構造を言及しうる例である。 d^8 のNi(II)は、四面体を形成することはまれであり、八面体より長波長で吸収を示すが吸収の強い点は共通する。八面体は、赤外、可視あ

るいは紫外部に三つの吸収帯を有し、緑、青、紫などを呈する。一方、平面型は可視部に ϵ が 1 縦大きい一つの吸収帯をもち、黄ないし赤色を呈する。従って、ペニシラミン並びにその関連化合物の Ni キレートは、いずれも橙色～桃色を呈し、 $470 \sim 520 \text{ m}\mu$ に数百の分子吸光係数を有する吸収を示すことから、典型的な平面正方形型構造であることが示唆される。近年、 $d-d$ 遷移吸収帯を理論的に解析する場合、いわゆる配位子場の理論が応用され、特に遷移金属イオンの八面体錯体に関しては極めて重要な知見が得られている。たとえば、結晶場の弱い八面体配位の Ni(II) 錯体では、 ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{2g}$, ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{F})$ および ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{P})$ 遷移に対応した三個の吸収帯が観測されることが明らかにされている。しかし、ペニシラミン Ni キレートのように結晶場が強くなると基底項が ${}^1\text{A}_{1g}$ (反磁性)にかわり、一応、 $468 \text{ m}\mu$ (21368 cm^{-1}) の吸収帯は ${}^1\text{A}_{1g} \rightarrow {}^1\text{A}_{2g}$ への遷移に帰属させたいところであるが、平面正方形の Ni(II) 錯体の場合には π 結合による効果が無視できないこともあって単純な結晶場による取り扱いでは、その吸収スペクトルを定量的に説明することは現在のところ困難である。¹⁶⁾

¹⁷⁾
Reilly らが、EDTA 金属錯体の溶存状態を NMR 法を用いることによって巧みに解明して以来、金属錯体の研究に対する NMR 法の有用性が認められてきたが、未だその適用例は少ない。ペニシラミンと Cd^{2+} , Hg^{2+} および Pb^{2+} とのキレート生成反応、特にこれら金属イオンに対するペニシラミン分子中のカルボキシル基からの配位に関するより満足すべき情報を得るため、水溶液中における NMR スペクトルを測定した。Fig. 13 は、 $\text{pH } 2.5$ におけるペニシラミン自身の NMR スペクトルであるが、メチンプロトンとメチル基のプロトンの両方が観測される。 pH を変化させて NMR スペクトルを測定すると、メチンプロトンおよびメチル基のプロトンともに二つの領域において化学シフトに大きな変動が見られるが、後者よりも前者の方がその変化が顕著であるので、以降は主としてメチンプロ

トンの動きに注目した。pHの関数としてのメチンプロトンの化学シフトの様子を Fig. 14 に示した。

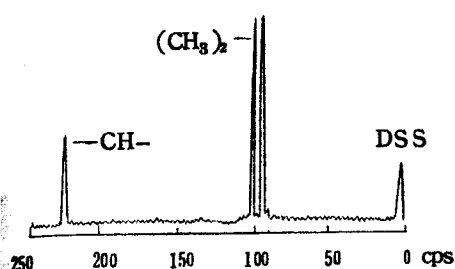


Fig. 13. Proton Magnetic Resonance Spectrum of Penicillamine at pH 2.5

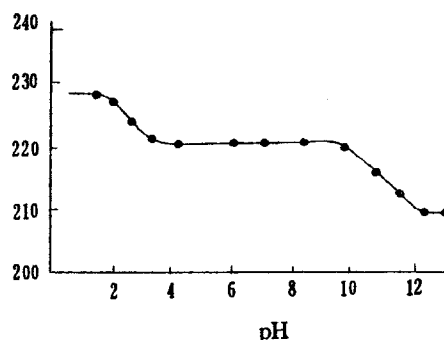


Fig. 14. Effect of pH on Chemical Shift of Methine Proton of Penicillamine in Aqueous Solution

Fig. 14 においてメチンプロトンの化学シフトには、pH 2～3 および pH 9～12 の二つの領域で大きな変動が見られるが、この変動は、ペニシラミンの脱プロトン化すなわち酸解離 ($pK_1 < 2.5$, $pK_2 = 8.09$, $pK_3 = 10.55$) と関連していると考えられ、第一の変動は COOH の COO^- への解離に、また第二の変動はアミノ基およびチオール基の酸解離に帰因していると考えるとよく理解できる。

次にペニシラミン対金属を1対1に混ぜ、pHを変化させてそのNMRスペクトルを測定すると、ペニシラミン単独のスペクトルに比較して低磁場シフトしていることが観測される。これは、キレート生成によってペニシラミン分子が固定化されることを示している。そこで、そのpH値における Cd(II) , Hg(II) および Pb(II) キレートのメチンプロトンのシグナル位置と配位子自身のシグナル位置との化学シフトの差 (ΔCPS) と pH との間の関係をプロットすると、Fig. 15 のような結果が得られた。

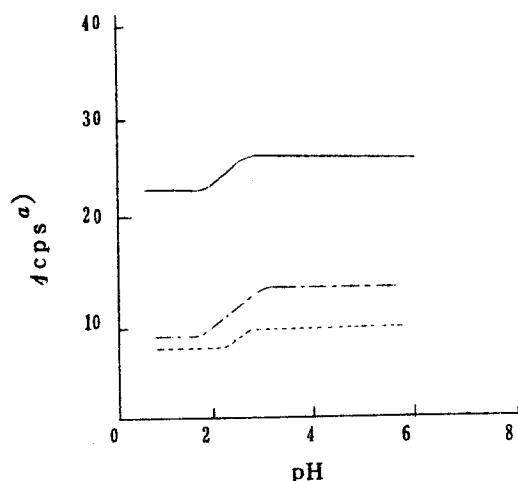


Fig. 15. Effect of pH on Chemical Shifts of Methine Proton of Penicillamine Chelates

— : mercury chelate - - - : lead chelate
 : cadmium chelate

a) values indicate the difference in chemical shift between penicillamine and its metal chelates

Fig. 15 に見られるように $Hg(II)$, $Pb(II)$, $Cd(II)$ キレートいずれの場合にも pH 2~3 の領域, すなわちペニシラミン分子中の $COOH$ が COO^- に解離する pH 域において, Δcps は, 著しい変動が観測される。この事実は, これら金属イオンへのカルボキシル基からの配位を直接的に示していると考えられる。さらに, pH 2~3 における化学シフトの変動の大きさは, $Pb^{2+} > Hg^{2+} > Cd^{2+}$ の順に減少し, この順序は Fig. 11 における $\Delta \log k_1$ の大きさの順序とよく対応している。おそらくこの順序は, これら金属イオンに対するペニシラミン分子中のカルボキシル基の親和性(配位の強さ)の順序を示していると考えられる。また, pH 4~6 の領域での化学シフトの大きさ(Δcps)は, $Cd^{2+} < Pb^{2+} < Hg^{2+}$ の順に増大しているが, この順序は, キレートの安定度の大きさとよい相関性を示して

いる。

ペニシラミンと Ni^{2+} あるいは Zn^{2+} との共存下でその NMR スペクトルを測定したところ、pH 2～3 の領域ではペニシラミン単独のスペクトルと全く一致し、それ故これら金属イオンに対するペニシラミン分子中のカルボキシル基からの配位は無視しうると考えられる。

このように NMR 法により、ペニシラミン分子中のカルボキシル基からの配位に関して直接的な知見が得られたこと、しかもその結果が電位差滴定法や電子スペクトル法から推定された結果とよく対応していることは、溶存状態の錯体の研究への NMR 法の有用性を示しているであろう。

第 4 節 ペニシラミンの重金属解毒効果とその金属キレートの配位の形式との相関性に関する考察

金属キレート生成反応と関係のある生理・薬理作用の中でキレート剤による有害金属の解毒除去作用は、キレート生成反応と最も明確な関連性が認められるものである。最近ペニシラミンは、水銀中毒や鉛中毒に対する優れた解毒剤として臨床医学領域で使用されてきている。一方、ペニシラミン金属キレートの物理化学的性質をみると、第 2 節で指摘したように Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} などのアルカリ土類金属に対するペニシラミンの親和性は極めて小さいのに対し、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} などの遷移金属や重金属に対しては非常に高い親和性を有している。しかし、ペニシラミンの構造からも推察されるように解毒効果に関与する化学反応は複雑である。たとえば、ペニシラミンはその分子中に SH 基、 NH_2 基および COOH 基三種の配位基を有し、その金属キレートは第 2 節で示したごとく四種の配位のタイプ (a, b, c, d) が可能である。この場合反応する金属イオン、反応種の濃度および pH などの反応環境によって配位のタイプに相異が見られるが、電位差滴定法、電子スペクトル法および核磁気

共鳴法によって明らかにされた金属イオンの種類から見た配位のタイプをまとめてみると次のようになる。

Table VI. Coordination Modes of Penicillamine Chelates

Mode	Metal ion
a(N—O type)	—
b(S—O type)	—
c(S—N type)	Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺
d(S—N—O type)	Pt ²⁺ , Pd ²⁺ , Sn ²⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺

金属中毒に対するペニシラミンの効果は、特にHg, Pb, Au, Pt, Cd, Tlなどの原子番号の大きい金属イオンに対して顕著であることが報告されており¹⁸⁾、そしてこれら金属イオンとペニシラミンとで形成されるキレートの配位の形式は、いずれも(d)タイプ、すなわちペニシラミン分子中のSH基、NH₂基およびCOOH基がともに関与したキレートであることが指摘できることは非常に興味深い。何故ならば、(d)タイプのキレートは、

1. (a), (b), (c)タイプのキレートに比較して安定である。
2. 電荷が中和されており(ただしSH基、NH₂基およびCOOH基などの極性基が存在するため水溶性である)、生体膜通過などにおいて、(a), (b), (c)タイプよりも静電的反発が少ないと考えられる。
3. 環境条件によって(c)タイプの配位をもとり得、またある種の条件下では混合配位子キレートを形成することができる。(この点については第3章で詳述する。)

などの性質を有し、錯体化学の面から見て重金属解毒において有利であると考えられる。

第2章 ペニシラミンならびにその関連化合物と Cu(II)

との酸化還元・錯生成反応

ウイルソン氏病は、進行性の錐体外路症状と肝硬変の合併が特徴の疾患である。近年、診断技術の進歩に伴って本症例の報告も著しく増加し日本における頻度は、出生15000～30000人に1人程度と推定されている。本症の本態は、遺伝性の銅たんぱく代謝の異常であろうと考えられている。ウイルソン氏病患者の脳や肝臓には多量の銅の蓄積があり、ウイルソン氏病には慢性の銅中毒が重要な役割を果していることが明らかにされた。¹⁹⁾このことから、銅排泄効果のもっとも著しいペニシラミンが、最も標準的なウイルソン氏病の治療剤として注目されるようになってきた。²⁰⁾しかしながら、ペニシラミンの詳細な作用機序をはじめ、種々のペニシラミン関連化合物中における銅排泄効果の大きな相異が何に基因しているのか、などについては全く不明である。そのみならずペニシラミンと Cu(II) との反応に関する基礎的研究もほとんど行なわれていない。これは前章で述べた金属イオンに対するペニシラミン分子中の配位基による配位形式の多様性の他に、一般に S H 化合物と Cu(II) との反応に見られるチオール \rightleftharpoons ジスルフィドと $\text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons \text{Cu}^+$ との酸化還元反応が加わり、反応を非常に複雑にしているためと考えられる。ペニシラミンによる生体からの銅移動には、おそらくこの酸化還元反応と錯生成反応とが微妙に関連していることが予想されるので、まずペニシラミンと Cu(II) イオンとの反応を基礎的に詳細に追究することを計画した。

第1節 ペニシラミンとCu(II)との還元的キレート生成反応

ペニシラミンは、他の遷移金属に対してと同様、Cu(II)に対しても強力なキレート剤と考えられるが、単なるそのキレート生成能だけではウィルソン氏病の場合のように毒性を示す銅の代謝に対して効果的であるとは考え難い。何故ならば、遷移金属に対してペニシラミンと同程度もしくはそれ以上に親和性を有するEDTAでは、毒性銅の排泄に効果が観察されないからである。電子伝達系やモノアミン酸化系のような生化学過程においては、Cu(II)やSH基の酸化還元能が極めて重要であるが、ペニシラミンの銅移動作用にもその分子中に存在するSH基が特に重要な貢献をしていることが推定される。このような観点から、ペニシラミンとCu(II)との還元的キレート生成反応を電子スペクトルおよび電位差滴定法によって検討を行ない、若干の興味深い知見を得た。

実験方法

試薬：DL-ペニシラミン並びにその関連化合物および水酸化ナトリウム標準溶液は、第1章で記述した方法に準じて得た。Cu(II)標準溶液は、試薬特級のCuCl₂から調製し、そしてEDTA標準溶液で標定した。またCu(I)標準溶液は、CuCl₂溶液を塩酸ヒドロキシルアミンで還元することによって調製した。その他の試薬は、すべて試薬特級品を使用した。

Cu(II)およびCu(I)イオンとペニシラミンとの呈色反応：pH 6.2の条件下、窒素ガスを通じながらペニシラミン溶液(1%)にCu(II)またはCu(I)イオン溶液を加えて、反応溶液の呈色変化を観察した。pHの調節には、リン酸緩衝液を用いた。

電子吸収スペクトルの測定：窒素ガスを通ずることによって得られたCu(II)およびペニシラミンの脱炭酸溶液を混合し、日立自記分光光度計EPS-2型でその吸収スペクトルを測定した。また、すべての吸光度の測定には島津分光光度計QV-50型を使用した。

電位差滴定：すべての滴定は、第1章第1節に記述した操作に準じて温度

22 ± 0.5°, イオン強度 0.1 (KNO₃) の条件下, 窒素気流中で行なった。
pH の測定には, メトローム社製 pH メーター E300-B 型を使用した。

結果と考察

Cu(II) および Cu(I) イオンとペニシラミンとのスポット反応の結果が, Table VII に集約されている。

Table VII. Spot Test

Ligand	Metal ion	Color
SH ^{a)}	Cu ²⁺	violet
SH	Cu ⁺	pale yellow
S-S ^{b)}	Cu ²⁺	pale blue
S-S	Cu ⁺	colorless
SH	Cu ²⁺ + Cu ⁺	violet
S-S	Cu ²⁺ + Cu ⁺	pale blue
SH + S-S	Cu ²⁺	pale violet
SH + S-S	Cu ⁺	pale yellow

a) SH: penicillamine

b) S-S: penicillamine disulfide

これをみると, ペニシラミンと Cu との反応では明らかに二種類の錯体, すなわち赤紫色錯体と黄色錯体の生成が認められる。そして, ペニシラミンと Cu(II) イオンとのモル比をかえて混合した溶液の吸収スペクトルもまた, Fig. 16 に示すように全く異なった二種のキレートの生成を示唆している。このような現象は, pH 4 ~ 8 の範囲で同じように観察されるので, 以降の実験は pH 6.2 に設定して行なった。

Cu(II) イオンに対してペニシラミンが大過剰存在している場合には, うすい黄色のキレートが生成し, その吸収スペクトルは可視部領域には tail

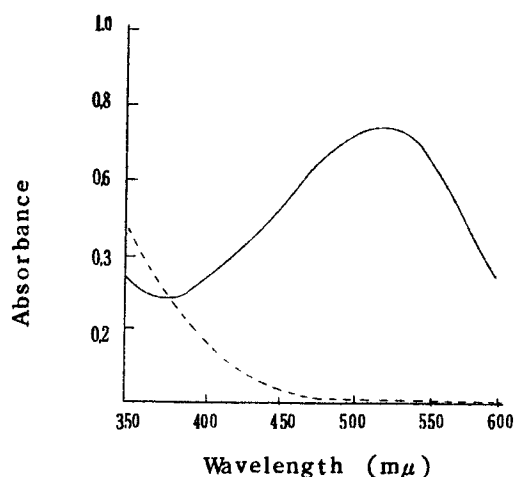


Fig. 16. Absorption Spectra of Copper Complexes of Penicillamine
 — : 1.0×10^{-3} M of copper(II) and 1.4×10^{-3} M of penicillamine
 - - - : 5.0×10^{-4} M of copper(II) and 1.0×10^{-2} M of penicillamine
 pH 6.2

を残すのみで全く吸収極大を持たない。そしてこの黄色キレートは、ペニシラミンと Cu(I) とから生成されるキレートの吸収スペクトルと一致することから、ペニシラミン Cu(I) キレートではないかと推定される。一方、Cu(II) イオンがペニシラミンと等モル程度もしくは過剰に存在している条件下では、赤紫色キレートが生成し、その吸収スペクトルは波長 520 mμ に吸光係数の高い、幅の広い吸収極大を示す。d⁹ の Cu(II) 錯体は、歪んだ八面体（もちろん、その極限としては平面正方形構造をとる）あるいは四面体型のいずれかの構造が可能であるが、一般に四面体型および八面体型 Cu(II) 錯体は、かなり長波長部に吸収を示し、またその分子吸光係数も小さい。たとえば、典型的な四面体型構造をとる $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ は、600 mμ (ϵ : ~20)¹⁶⁾、660 (~40) および 750 (~25) に配位子場吸収を示す。本赤紫色キレートは、吸収帯の位置や吸収強度から考²¹⁾えて Cu(I) — 塩素 — Cu(II) 錯体 や Cu(I) — チオリンゴ酸 — Cu(II)

²²⁾キレートで観察されている、いわゆる Cu(I) — Cu(II) による相互作用色ではないかと推定される。最近、Day と Smith は、塩素 Cu(I, II) 混合原子価錯体に関する基礎的かつ理論的研究の中で、分子内電荷移動が生ずる場合にはドナー（電子供与体）軌道とアセプター（受容体）軌道との間に直接の重なりがおこり、そして約 10^3 程度の吸光係数をもつ混合原子価キレートが存在することを指摘している。²²⁾ 同様の暗示は、²³⁾ Hemmerich によっても述べられている。従って、Cu(II) 過剰の条件下において生成する赤紫色キレートは、ペニシラミン Cu(I, II) 混合原子価キレートであろうと推定され、そしてその高い吸光係数は、混合原子価キレート内における電荷移動過程に基づいていると考えられる。一般に、金属錯体の電荷移動吸収帯の多くは、配位子から中心原子の反結合性軌道への電子移動に基づいているが、ペニシラミン Cu(I, II) キレートのように低原子価金属 Cu⁺ が存在すると d 電子が π 結合を通して金属から未占の配位子軌道に流れる、いわゆる back-donation 効果が加わりその電荷移動性結合が安定化されるのではないかと考えられる。事実、このような相互作用は、金属カルボニル化合物においても見られるように金属イオンが低原子価のときに生じやすいことが知られており、ここに Cu⁺(d¹⁰) をはじめ、Co²⁺(d⁷), Fe²⁺(d⁶), Mo⁵⁺(d¹) のような金属が、酸化還元的にも生理学的にも重要であることを示す一つの根拠となるであろう。

赤紫色キレートならびに黄色キレートの生成機構を検討するため、Cu(II) 濃度を一定にしてペニシラミン濃度を変え 520 m μ での吸光度の変化を追究したところ、Fig. 17 に見られるように [配位子] / [Cu(II)] の比が 1.35 付近までは直線的に増加するが、この比よりも大きくなると吸光度は急激に減少した。

同様に、配位子濃度を一定にして Cu(II) 濃度を変化させると、Fig. 18 のように [Cu(II)] / [配位子] の比が 0.5 付近までは吸光度は極めて低いが、0.5 以上になると鋭く上昇し、そしてその比が 0.75 付近で吸光度は

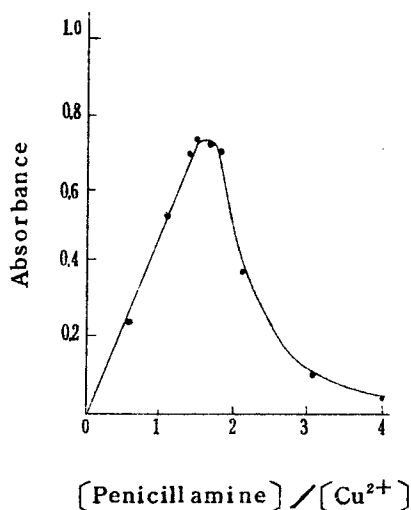


Fig.17. Change in Absorbance
at 520 mμ with Ratio of
Penicillamine to Copper

concentration of copper(II):
 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ pH 6.2

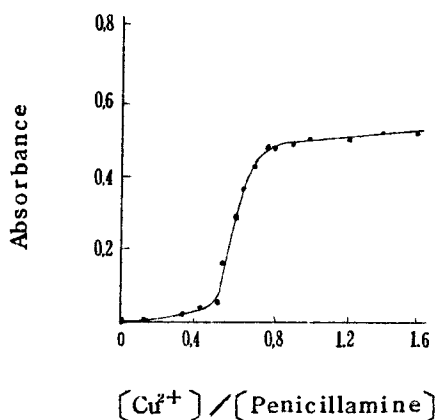


Fig.18. Change in Absorbance
at 520 mμ with Ratio of
Copper to Penicillamine

concentration of penicillamine:
 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ pH 6.2

一定となる現象が観測された。

さらに、ペニシラミンと Cu(II) とをモル比で 1 : 1, 1.3 : 1, 1.5 : 1, 1.8 : 1 および 2 : 1 の割合に混合した溶液を、それぞれアルカリ標準溶液で滴定を行なった結果を Fig. 19 に示した。

混合比 1 : 1 の滴定曲線は、 $a = 1$ で pH ジャンプを示すが、他の混合比での滴定曲線は、いずれも $a = 2$ で inflection を与えた。すべての滴定曲線の中で配位子 : Cu(II) = 1.3 : 1 の場合の inflection が最も鋭く、この現象は、吸収スペクトル測定でみられた現象とよく対応している。このような実験データに基づいて、ペニシラミンと Cu(II) との反応で生成する赤紫色キレートに対して Fig. 20 のような生成機構が最も妥当である

と考えられる。

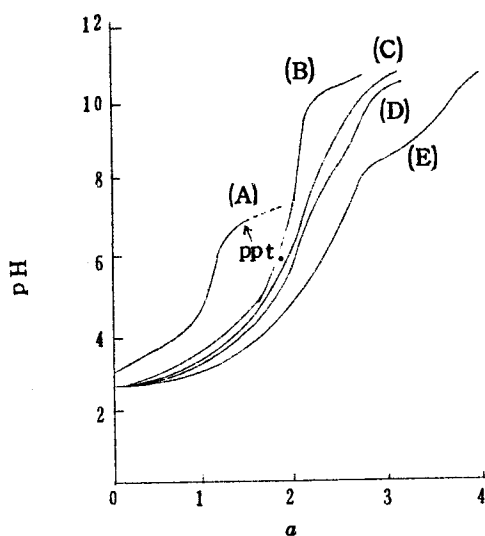


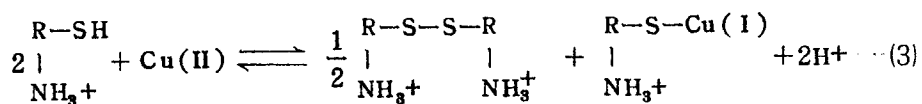
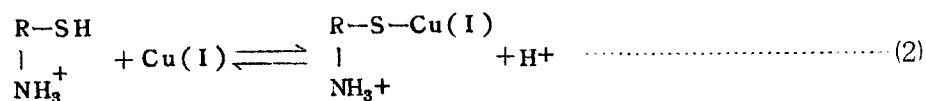
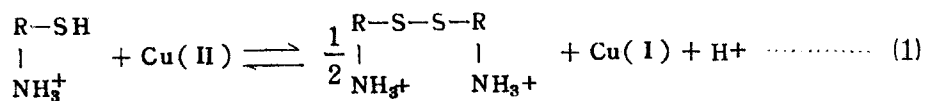
Fig. 19. Titration Curves of Penicillamine with Cupric Chloride

ligand to metal ratio

(A) : 1.0 : 1.0 (B) : 1.3 : 1.0 (C) : 1.5 : 1.0

(D) : 1.8 : 1.0 (E) : 2.0 : 1.0

a : moles of base per metal



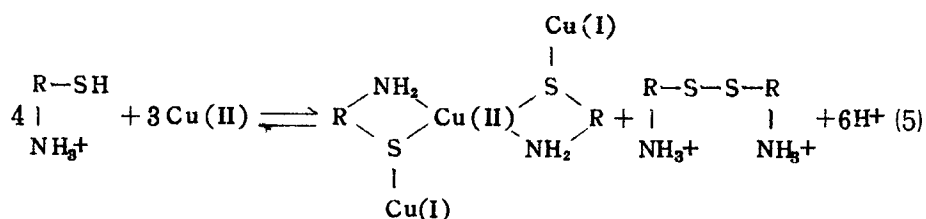
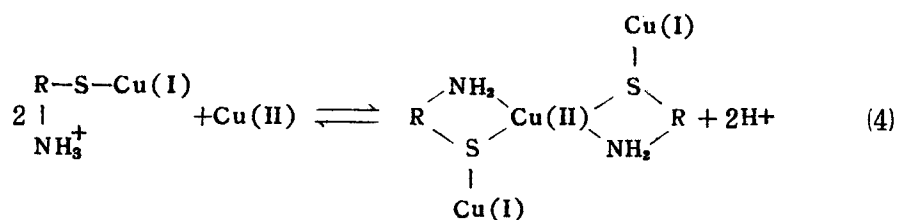


Fig. 20. Probable Formation Mechanism of Red-violet Complex

すなわち、ペニシラミンは初期 Cu(II) イオンによって一部酸化されてペニシラミンジスルフィドになり、そして同時に還元された Cu(I) は、ペニシラミンと反応して黄色のペニシラミン Cu(I) キレートを生成する。さらに過剰の Cu(II) イオンが存在すると、(4)式に従って赤紫色キレート、すなわちペニシラミン Cu(I, II) 混合原子価キレートを生成する。それ故、ペニシラミンと Cu(II) イオンとの反応における全 (over all) 反応は、(5)式のように表わされるであろう。ペニシラミンが Cu(II) イオンに対して大過剰存在している時は、(3)式に従って黄色キレートが生成される。何故ならば、この条件下では(4)式の反応が進行しないからである。

このように、ペニシラミンが Cu(II) イオンとの還元的キレート生成反応によって、安定なペニシラミン Cu(I, II) 混合原子価キレートあるいはペニシラミン Cu(I) キレートを生成することが明らかにされたが、ウィルソン氏病患者におけるペニシラミンによる銅移動過程を知る上でも、また一般に S H 化合物と Cu(II) イオンとの反応を知る上でも本節で得られた

知見は、極めて有用なものと考えられる。

第2節 ペニシラミンCu(I, II) 混合原子価キレートの単離と構造

赤紫色キレート中にCu(I)が共存していることは、Cu(I)に対する特異的試薬であるクプロインとの呈色反応によって認められるが、前節のFig. 20に示された反応機構を確認するため、ペニシラミンとCu(II)イオンとをモル比で1.35:1および15:1に混ぜた反応溶液から、それぞれ赤紫色キレートおよび黄色キレートを単離し、そして赤外吸収スペクトルよりそのキレートの構造を推定した。

実験方法

銅キレートの単離: CuCl_2 (85 mg) とペニシラミン (100 mg) とをpH 6.2で反応させ、生成した赤紫色溶液を減圧下濃縮すると粗製の紫色残渣が得られる。この残渣を少量の水に溶解し、ついで過剰のアセトンを加えると紫色沈澱が生成する。沈澱を濾取し、乾燥する。この水—アセトンによる再沈澱操作を数回くりかえして純粋な紫色結晶を得た。最後に結晶を濾取したのち、エタノールで洗浄を行ない、乾燥させる。収量70 mg。

m. p. 174 ~ 176 ° (decomp.)。Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}_2\text{Cu}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 23.05; H, 4.26; Cu, 36.09. Found: C, 23.49; H, 4.65; Cu, 36.58.

また上記濾液から溶媒を留去すると、白色の結晶が得られ、これを水—エタノールから再結晶した。収量35 mg。m. p. 205 ~ 206 °。

本化合物の融点およびその赤外吸収スペクトルは、別途合成されたペニシラミンジスルフィドのそれと合致することが確認された。

ペニシラミン (190 mg) を少量のpH 6.2の緩衝液に溶解し、これに攪拌しながら CuCl_2 (20 mg) の水溶液を加えるとうすい黄色の沈澱を生成する。一時間攪拌を続けたのち、黄色沈澱を濾取し、数回水—エタノー

ルで洗淨する。収量 20 mg。 m. p. 191 ~ 192 ° (decomp.)。

Anal. Calcd. for $C_5H_{10}O_2NSCu \cdot H_2O$: C, 26.14 ; H, 5.26 ; Cu, 27.66. Found : C, 26.39 ; H, 5.36 ; Cu, 27.37.

赤外吸収スペクトルの測定：単離した赤紫色キレート，黄色キレートおよびペニシラミン自身の赤外吸収スペクトルを KBr 錠剤法で，光研 DS 301 型赤外分光光度計を用いて測定した。

結果と考察

赤紫色キレートの赤外吸収スペクトルを，黄色キレートおよび配位子のそれと対比して Fig. 21 に示した。

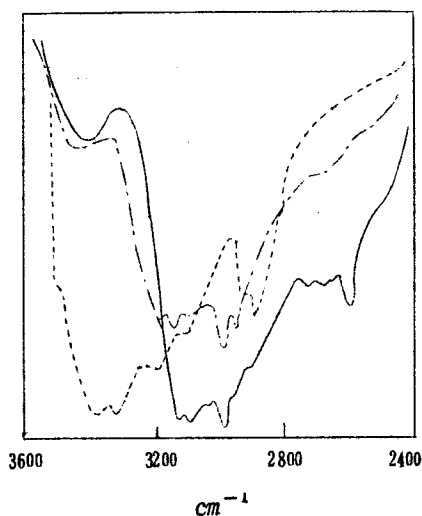


Fig. 21. Infrared Spectra (in KBr)

———— : penicillamine
 ----- : red-violet complex
 - · - · - : yellow complex

ペニシラミンは，
$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{C} - \text{CH} - \text{COO}^-$$

$$\begin{array}{c} | \\ \text{SH} \end{array} \quad \begin{array}{c} | \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$$
 の zwitter ion の形で存在

するため、 -NH_3^+ に基づく振動数が 3100 cm^{-1} 付近に現われ、またS H基の伸縮振動が 2500 cm^{-1} 付近に観測される。赤紫色キレートのスペクトルをみると、 2500 cm^{-1} のS H基による吸収が消失し、また -NH_3^+ による吸収も消失し新たに NH_2 基の伸縮振動に基づく吸収が 3400 cm^{-1} 付近にあらわれ、金属—窒素間の共有結合の形成によってN H伸縮振動帯が移動したことを示している。一方、黄色キレートでは配位子に見られたS H基に基づく吸収は消失しているが、N H伸縮振動帯では 3100 cm^{-1} 付近に配位子と同様の吸収が見られ、黄色キレートにおいては窒素原子からの配位は関与していないものと考えられる。これらの知見に基づいて、ペニシラミンと Cu(II) との反応で生成される安定な赤紫色キレートに対して、Fig. 22のような分子構造が提案される。

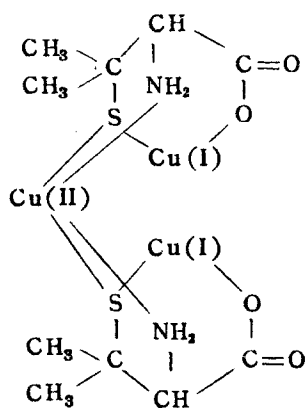


Fig. 22. Structure of Red-violet Complex

分子モデルによってこの分子配置を組んでみると立体的に十分可能であり、そして Cu(II) は、 S^- と NH_2 とによって平面四配位構造を形成し、しかも二個のメチル基が中心金属 Cu(II) を保護するようにおおような形になって、分子全体が固定化され極めて安定な構造を形成している。また、ジメチル基の一方がエチル基で置換されると分子が一層固定化されるが、

ジメチル基が存在しないと Cu(II) は完全に表面に露出する状態になり、加水分解その他の反応を受け易い構造となる。従って、このような錯体分子の安定化には、立体的因子特に置換基の影響が大きく関係しているのではないかと推測される。

第 3 節 ペニシラミン関連化合物の Cu(II) との錯生成能とその尿中銅排泄効果との相関性に関する考察

Aposhian らは、ウイルソン氏病患者に対するペニシラミン関連化合物の尿中銅排泄効果を検討し、次のような結果を報告している。¹³⁾

- (1) ウイルソン氏病患者の尿中銅排泄を増加させる効果があるもの。

Penicillamine, β -Methyl- β -ethylcysteine

- (2) ウイルソン氏病患者の尿中銅排泄を増加させる効果がないもの。

N-Acetylpenicillamine, Cysteine

β -Methylcysteine, Penicillamine disulfide

これらの化合物は、お互に極めて類似した構造を有していることから、構造上のわずかな変化がその銅移動効果に大きな相異をもたらしていることがうかがわれる。ペニシラミン関連化合物による銅移動効果の相異に対する一つの理由として、これら化合物の生体内運命、とりわけアミノ酸酸化酵素による分解反応に対する態度の相異が考えられる。事実、システインの β 位の炭素原子の置換基が増加すると、すなわち $(\text{CH}_3)_2\text{C}->\text{CH}_3-\text{CH}->\text{CH}_2-$ の順にアミノ酸酸化酵素の作用を受けやすくなることが知られている。²⁴⁾ しかしながら、N-アセチルペニシラミンではこの種の生体内反応を極めて受けにくいにもかかわらず、銅移動に対して不活性であるなど、代謝速度の面からのみではうまく説明がつかないことも多い。 β -メチル- β -エチルシステインがペニシラミンより銅排泄効果が高いこと、また同じ基本骨格をもつシステインでは効果が見られないことを考え合わ

せると、システインの β 炭素原子の置換基の大きさが、 Cu(II) イオンとの微妙な還元的キレート生成反応に大きな相異を与えているのではないかと推定された。そこで、この点について検討するため Table VII に示すようなペニシラミン関連化合物と Cu(II) との酸化還元・錯生成反応を中性付近の条件下、吸収スペクトルによって追究した。

Table VII. Penicillamine and Its Related Compounds

I	penicillamine	β -methyl- β -ethylcysteine
II	N-acetylpenicillamine	N-formylpenicillamine
	penicillamine methyl ester	N-acetyl- β -methyl- β -ethylcysteine
	β -mercaptoisovaleric acid	α -amino- β -mercaptoisobutane
III	cysteine N-acetylcysteine	α -amino- β -mercaptopropane
	2-mercaptoethylamine	α -mercaptopropionyl glycine
IV	valine S-methylpenicillamine	penicillamine disulfide

これら化合物と Cu(II) イオンとの反応で生成するキレートの吸収スペクトルおよびそのキレートの呈色の安定性を、それぞれ Fig. 23 と Fig. 24 に示した。

これらの結果から、配位子の化学構造と Cu(II) との錯生成反応との間に次のような興味ある関連性が観察された。すなわち、システインの β 炭素原子に二個の置換基を有する Table VII のグループ I および II の化合物は、置換基をもたないかあるいは一個有するグループ III の化合物よりも混合原子価キレートと考えられる安定な赤紫色キレートをはるかに容易に形成し、また分子内に SH , NH_2 および COOH 三つの配位基を有するグループ I の化合物は、分子中に二つの配位基 (SH と NH_2 あるいは SH と COOH) を有するグループ II の化合物に比較して、圧倒的に安定な混合原子価キレートを生成する。分子内に遊離の SH 基をもたないグループ IV の化合物は、

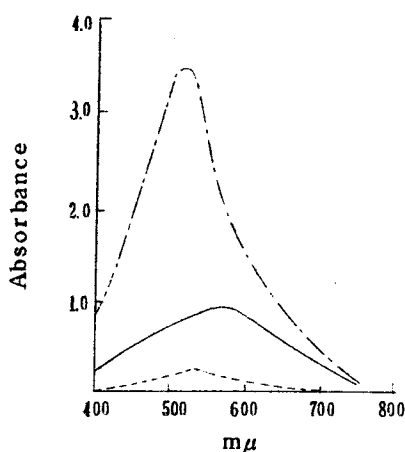


Fig. 23. Absorption Spectra of Copper Complexes

-----: penicillamine

————: N-acetylpenicillamine

.....: 2-mercaptoethylamine

concentration of copper(II):

8.0×10^{-3} M

concentration of thiol compounds: 4.0×10^{-3} M

pH 6.2

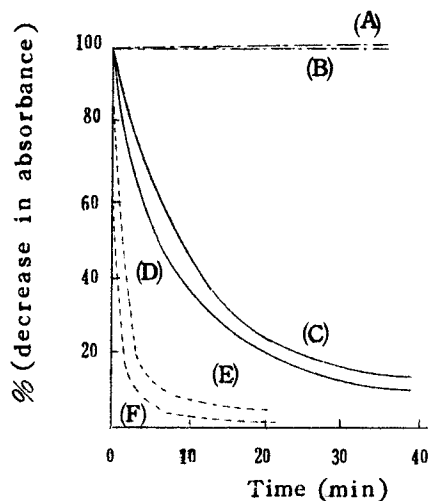


Fig. 24. Stability of Color of Red-violet Complexes

ligand

(A): β -methyl- β -ethylcysteine

(B): penicillamine

(C): N-acetylpenicillamine

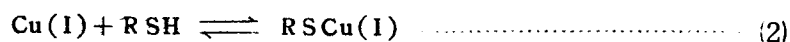
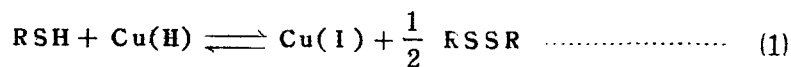
(D): N-formylpenicillamine

(E): 2-mercaptoethylamine

(F): α -amino- β -mercaptopropane

当然のことながらこのような酸化還元反応を全くおこさない。

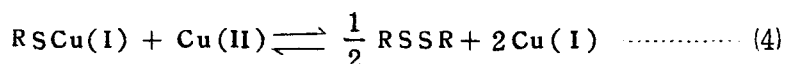
一般に、システインをはじめ多くのメルカプト化合物は、Cu(II)と次のような反応をおこすであろうと考えられている。



(1)+(2) より



そして、過剰の Cu(II) の存在下では、



のような反応が進行するのに対し、ペニシラミンでは第1節で述べた混合原子価キレートの生成反応が優っていると考えられる。このようにシステインのβ炭素原子の置換基が配位子の酸化還元能に大きな相異を与えていることは、前述のシステインβ炭素原子の置換基が増加するとL-およびD-アミノ酸酸化酵素による分子の分解が減少するという事実と考え合わせると、これら化合物の生物活性を考察する場合、極めて興味ある知見であると考えられる。また、上記観察は $Cu^{2+} - Cu^{+}$ 系の酸化還元電位におよぼすSH化合物の影響は、配位子の分子構造や分子物性によって著しく異なっていることを暗示しているが、それとともに同一の金属イオン系においても適当な配位子を選択することによって、特異性の高い生物活性をもたらすことができることを示唆している。

さらに、ペニシラミン関連化合物の尿中銅排泄効果とそのCu(II)とのキレート生成能との間の相関性について考察してみると、次のような興味深い現象が観察される。すなわち、銅排泄効果のあるペニシラミンやβ-メチル-β-エチルシステインでは非常に安定な混合原子価キレートを生成するのに対し、一方効果のないシステインやN-アセチルペニシラミンではこのような安定なキレートの生成は認められない。このようなことから、ペニシラミンの銅解毒にはその還元的キレート生成反応が重要な役割を演じていることが考えられ、また混合原子価キレートは、除去過程における重要な錯体種または中間体ではないかと考えられる。何故ならば、本キレートは、

- (1) 生理的pH域において生成し、空気や還元剤に対しても安定である。
- (2) キレート全体の電荷は中和されているが、分子中の多くの極性基のため水溶性が高い。

などの性質を有し、これは腎臓通過性の一般的条件である生成キレートが比較的 low molecular weight で水溶性拡散性であるという条件を満たしていると考えられる。もちろん、腎臓通過性に関してはもっと多くの因子がからみあっているので簡単には議論できないが、少なくとも錯体化学的に見て上述のような特徴をそなえている。実際、銅の膜通過にはペニシラミンが作用しているということは、正常血漿を限外濾過しても銅の膜通過はほとんどなく $1 \sim 4 \mu g / 100 ml$ であるのに対し、D-ペニシラミンの存在下では血液中^{13,25)}の銅 $137 \mu g / 100 ml$ のうち $39 \mu g / 100 ml$ が濾過されるという報告からも支持されるであろう。

なお、銅移動に対するペニシラミンの還元的キレート生成反応の重要性に関しては、第二篇第3章においてアルブミン結合銅からの銅除去に関する研究でさらに詳述する。

第3章 ペニシラミンと他のS H化合物とを含む混合配位子Cd (II), Hg (II) および Pb (II) キレート生成反応

最近、混合配位子錯体（三重錯体）に関する研究は、錯体化学の分野でのみならず生化学の分野においても酵素—金属—基質系や複数金属—複数配位子系などのモデルとして、その重要性が強調されはじめているが、現在までのところ混合配位子錯体に関する定量的検討は、特殊な場合を除いてはほとんどなされていない。特に、生物学的に極めて重要であるS H基含有化合物が関与した混合配位子錯体に関する研究は、全く行なわれていない。

ペニシラミンの重金属解毒機構を考える場合、種々の生体内配位子との相互作用（競合反応）が当然予想される。HgやPbのような重金属は、遊離のチオール基を有する生体内配位子—グルタチオンや酵素—に結合した状態で存在していると考えられるので、ペニシラミンとS H基を含む他の配位子とが関与する一種の混合配位子錯体である三重錯体の生成は、解毒・除去反応に対する一つのモデル系と考えられる。このような観点から、ペニシラミン—金属—S H化合物の三成分系におけるキレート生成反応を電位差滴定法によって検討した。

第1節 電位差滴定法による混合配位子キレートの生成反応の検討

一般に、金属イオンの配位数が一つの配位子によって完全に飽和されていない金属錯体においては、この金属を仲介として別の配位子とも結合し得る余力を残しているため、混合配位子錯体の生成が比較的容易であると考えられる。第1章で指摘したようにHg(II), Pb(II), Cd(II)などの硫水素族の金属は、ペニシラミンと1対1のterdentate chelateを形成す

るので、四つの配位座のうち三つはペニシラミンの配位基によって占有されるが、残りの一つは水和水（アコ化）によって占められていると推定される。従って、他のSH化合物が共存した場合、混合配位子キレートの生成が十分期待される。2-メルカプトエチルアミン、グルタチオン、チオグリコール酸、N-アセチルペニシラミン、 α -メルカプトプロピオニルグリシンおよびペニシラミンメチルエステルのようなSH化合物について、ペニシラミンとの共存系でのキレート生成反応を電位差滴定法によって追究し、いくつかの興味ある知見を得た。

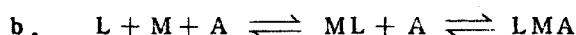
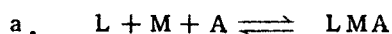
実験方法

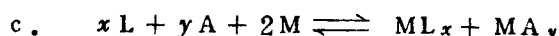
試薬：DL-ペニシラミン、ペニシラミンメチルエステル、N-アセチルペニシラミンおよび0.1 N水酸化カリウム標準溶液は、第1章第1節で記述したものを用いた。チオグリコール酸、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩、グルタチオン、 α -メルカプトプロピオニルグリシン、エチルメルカプタン、グリシンおよびヒスチジンは、試薬特級品を用い、そして必要に応じて再結晶して使用した。金属標準溶液は、試薬特級の $HgCl_2$ 、 $Pb(NO_3)_2$ 、 $Cd(NO_3)_2$ 、 $Ni(NO_3)_2$ そして $Zn(NO_3)_2$ を脱塩水に溶解し、これをEDTA標準溶液で標定して用いた。

電位差滴定：電位差滴定法は、第1章第1節で述べた場合と本質的に同じである。金属イオン（ $2.0 \times 10^{-3} M$ ）、ペニシラミン（ $2.0 \times 10^{-3} M$ ）およびsecondary配位子（ $2.0 \times 10^{-3} M$ ）をモル比で1対1対1に混合した溶液を、温度 $22 \pm 0.1^\circ$ 、イオン強度0.1の条件下、窒素ガスを通じながら0.1 N水酸化カリウム標準溶液で滴定した。

結果と考察

一般に、三成分系におけるキレート生成反応は、次の四つのタイプに分類することができる。²⁷⁾





ここで、L、AそしてMは、それぞれ第一次配位子(primary ligand)、第二次配位子(secondary ligand) および金属イオンを表わしており、そして電荷はいずれも省略してある。

まず、1 : 1 : 1 ペニシラミン— Hg^{2+} —N-アセチルペニシラミン 三成分系の滴定曲線を見ると、Fig. 25 (C)に示されるように $a = 3.0$ と $a = 4.0$ のところに二つの pH ジャンプが観察される。滴定曲線(C)の $a = 0$ から $a = 3.0$ までの領域は、1 : 1 Hg^{2+} —ペニシラミン(B)とN-アセチルペニシラミン(A)との滴定曲線を組み合わせた曲線とはほぼ一致している。このことは、1 : 1 Hg^{2+} —ペニシラミン系の滴定曲線があらかじめ1モル量の塩基を加えた混合配位子系の滴定曲線(D)と $a = 2.0$ までの領域において合致することからも支持される。しかしながら、混合配位子系(C)の $a = 3.0$ から $a = 4.0$ までの領域の pH は、明らかにN-アセチルペニシラミン単独の滴定曲線の pH よりも低下している。それ故、この三成分系においては、式(b)のようなタイプの二段階反応によって混合配位子キレートが生成していると考えられる。すなわち、 $a = 0$ から $a = 3.0$ までの領域は単純な1 : 1 ペニシラミン $Hg(II)$ キレートのみが生成するが、 $a = 3.0$ から $a = 4.0$ の領域になると1 : 1 ペニシラミン $Hg(II)$ キレートにN-アセチルペニシラミンが配位した1 : 1 : 1の混合配位子キレートが形成されることが考えられる。

1 : 1 : 1 ペニシラミン— M^{2+} —チオグリコール酸、グルタチオン、2-メルカプトエチルアミン、 α -メルカプトプロピオニルグリシンおよびペニシラミンメチルエステル系の滴定曲線もまた、Fig. 26 および Fig. 27 に見られるように $a = 3.0$ もしくは $a = 4.0$ で inflection を示している。それ故、これらの系においてもN-アセチルペニシラミン系と類似の反応、すなわち第一段階として単純な1 : 1 ペニシラミン金属キレートを生成し、

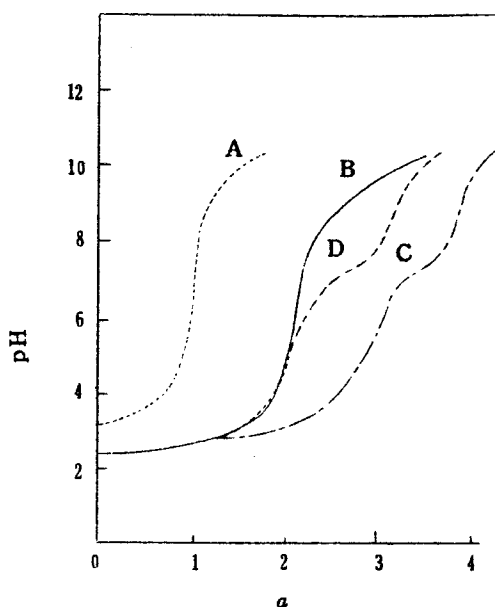


Fig. 25. Potentiometric Titrations of Mixed Ligand Systems of Penicillamine, Hg^{2+} and N-Acetylpenicillamine with Potassium Hydroxide

a = moles of base added per mole of metal ion

A : N-acetylpenicillamine

B : 1 : 1 Hg^{2+} penicillamine

C : 1 : 1 : 1 penicillamine- Hg^{2+} -N-acetylpenicillamine

D : 1 : 1 : 1 : 1 penicillamine- Hg^{2+} -N-acetylpenicillamine-alkali

ついで第二段階として secondary 配位子がペニシラミンキレートに配位した混合配位子キレートを生成すると推定される。

しかしながら、1 : 1 : 1 ペニシラミン- M^{2+} -エチルメルカプタン、グリシンおよびヒスチジン（ここで $M^{2+} = Hg^{2+}$, Pb^{2+} および Cd^{2+} ）系においては、その滴定曲線の $a = 0$ から $a = 2.0$ までの領域は、1 : 1 ペニ

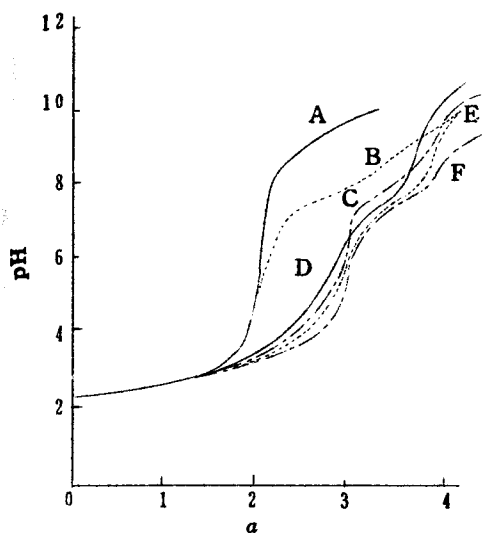


Fig. 26. Potentiometric Titrations of Mixed Ligand Chelate Systems of Hg^{2+} and Penicillamine with Potassium Hydroxide

a = moles of base added per mole of metal ion

- A : 1:1 Hg^{2+} -penicillamine
- B : 1:1:1 penicillamine- Hg^{2+} -2-mercaptoethylamine
- C : 1:1:1 penicillamine- Hg^{2+} -mercaptoacetic acid
- D : 1:1:1 penicillamine- Hg^{2+} -penicillamine methyl ester
- E : 1:1:1 penicillamine- Hg^{2+} - α -mercaptoacetylpropionylglycine
- F : 1:1:1 penicillamine- Hg^{2+} -glutathione

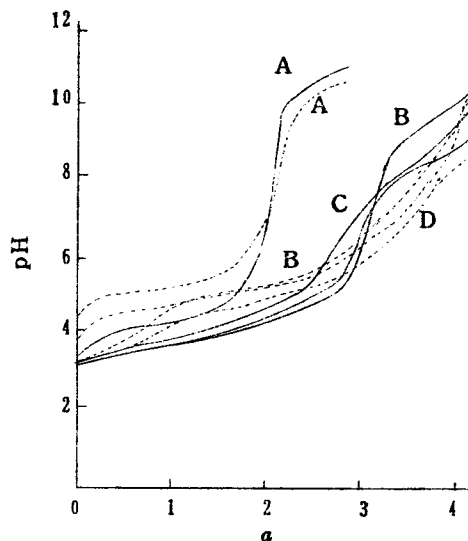


Fig. 27. Potentiometric Titrations of Mixed Ligand Chelate Systems of M^{2+} and Penicillamine with Potassium Hydroxide (where $\text{M}^{2+} = \text{Pb}^{2+}$ and Cd^{2+})

a = moles of base added per mole of metal ion

- A : 1:1 M^{2+} -penicillamine
 - B : 1:1:1 penicillamine- M^{2+} -N-acetylpenicillamine
 - C : 1:1:1 penicillamine- M^{2+} -penicillamine methyl ester
 - D : 1:1:1 penicillamine- M^{2+} -glutathione
- : Pb^{2+} - - - : Cd^{2+}

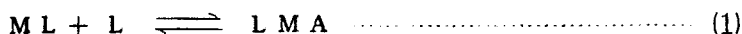
シラミン— M^{2+} 系の滴定曲線と一致し、また $a = 2.0$ から $a = 4.0$ までの領域は、secondary 配位子自身の滴定曲線に実験誤差範囲内で一致していた。従って、これらの三成分系では混合配位子キレートの存在を電位差滴定法によっては認めることはできなかった。

第2節 混合配位子キレートの生成定数の測定

前節の電位差滴定法によって混合配位子キレートの生成が認められた 2-メルカプトエチルアミン、N-アセチルペニシラミン、チオグリコール酸、グルタチオン、ペニシラミンメチルエステルおよび α -メルカプトプロピオニルグリシン六種のSH化合物に対して、混合配位子キレートの生成定数を算出した。

計算方法

1 : 1 ペニシラミン金属キレート (ML) に第二の配位子 (A) が結合する反応において、混合配位子キレートの生成定数を Thompson と Loraas²⁸⁾ が EDTA 系に対して用いた方法²⁸⁾ と類似の代数法によって計算した。



(1)式のように第一次キレート (ML) と第二次配位子 (A) とから形成される混合配位子キレート (LMA) の生成反応を考えると、金属イオンの総濃度 (C_M) と二次的配位子の総濃度 (C_A) は、それぞれ(2)式および(3)式によって表わされる。

$$C_M = [ML] + [LMA] \quad (2)$$

$$C_A = [H_2A] + [HA] + [A] + [LMA] \quad (3)$$

遊離の第一次配位子 (H_2L) を中和するのに 2 モルの塩基が必要であるから、A の 1 モル当りに加えられる塩基のモル数を a^* とすれば、電気的中性の原理より(4)式が得られる。

$$a^*C_A + [H] - [OH] = [HA] + 2[A] + 2[LMA] \quad (4)$$

(3)式と(4)式とを組み合わせることによって、第二次配位子の濃度([A])は、(5)式によって表わされる。

$$[A] = \frac{(2-a^*)C_A - [H] + [OH]}{2\frac{[H]^2}{K_1K_2} + \frac{[H]}{K_2}} \quad (5)$$

ここで、 K_1 と K_2 は A の酸解離定数である。そして反応(1)に対する生成定数 k は、次式によって計算される。

$$k = \frac{C_A - [A] \left\{ \frac{[H]^2}{K_1K_2} + \frac{[H]}{K_2} + 1 \right\}}{[A] \left\{ C_M - C_A + [A] \left(\frac{[H]}{K_1K_2} + \frac{[H]}{K_2} + 1 \right) \right\}} \quad (6)$$

計算結果

1 : 1 : 1 ペニシラミン- M^{2+} -SH化合物系において、各滴定曲線上の約10点を採用して(5)式および(6)式より、代数的に算出した混合配位子キレート生成定数を Table IX に示した。

Table IX. Formation Constants of Mixed Ligand Chelates from 1:1 Chelates of Cd^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} with Penicillamine (H_2L) and 1 Mole of Secondary Ligand (H_2A)

Secondary ligand	Acid dissociation constant pK_a	Equilibrium quotient	Formation constant, $\log k$		
			Cd^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{2+}
None	—	$\frac{[ML]}{[M][L]}$	10.92 ⁴⁾	16.4 ⁴⁾	12.88 ⁴⁾
2-Mercapto-ethylamine	8.35	$\frac{[LMA]}{[ML][A]}$	6.85±0.02	6.64±0.02	4.68±0.03
N-Acetylpenicillamine	10.81	$\frac{[ML]}{[A]}$	5.71±0.02	5.65±0.02	4.06±0.04
Mercaptoacetic acid	3.28	$\frac{[LMA]}{[ML][A]}$	5.19±0.03	5.09±0.01	4.16±0.01
	10.26	$\frac{[ML]}{[A]}$	5.73±0.03	5.33±0.03	4.47±0.02
Glutathione	3.42	$\frac{[LMA]}{[ML][A]}$	5.02±0.02	4.90±0.02	3.76±0.02
	10.20	$\frac{[ML]}{[A]}$	4.46±0.03	4.38±0.01	3.30±0.03
Penicillanine methyl ester	8.75	$\frac{[LMA]}{[ML][A]}$			
α -Mercaptopropionyl glycine	9.65	$\frac{[ML]}{[A]}$			
	6.30	$\frac{[LMA]}{[ML][A]}$			
	9.17	$\frac{[ML]}{[A]}$			
	3.60	$\frac{[LMA]}{[ML][A]}$			
	8.74	$\frac{[ML]}{[A]}$			

第3節 混合配位子キレートの生成機構

本混合配位子キレートの生成定数は、Fig. 28に見られるように secondary 配位子分子中の SH 基の解離定数とはほぼ直線的に関連しているが、このことは、混合配位子キレートの生成において二次的配位子の SH 基の S^- 基への解離が大きく関係していることを暗示していると考えられる。

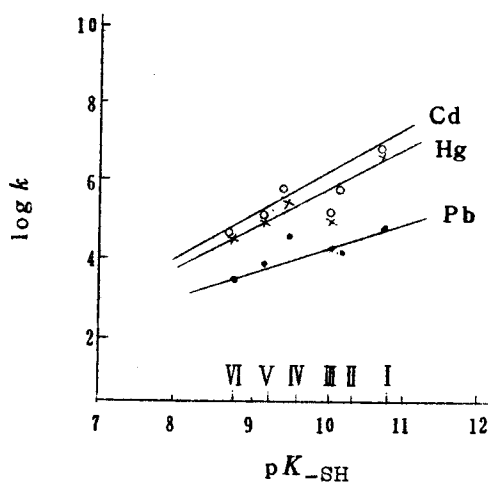


Fig. 28. Correlation of Formation Constants of Mixed Ligand Chelates and Dissociation Constant of Sulfhydryl Group in Secondary Ligands

- I: 2-mercaptoethylamine
- II: N-acetylpenicillamine
- III: mercaptoacetic acid
- IV: glutathione
- V: penicillamine methyl ester
- VI: α -mercaptopropionyl glycine

また、第1章第2節および第3節で明らかにしたように primary キレートとしてのペニシラミン金属キレートにおけるカルボキシル基からの配位の強さは、 $\text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ の順に減少していたが、一方本混合配位

子キレート生成定数は、逆に $Pb^{2+} < Hg^{2+} < Cd^{2+}$ の順に増大している。ペニシラミン分子中のカルボキシル基からの配位の強さを示すパラメーターとして有用であった $\Delta \log k'$ (ペニシラミンキレートとペニシラミンメチルエステルキレートとの生成定数の差) および Δcps (pH 2~3 におけるペニシラミンとペニシラミンキレートとのメチンプロトンの化学シフトの差) と本混合配位子キレートの生成定数 ($\log k$) との間には、Fig. 29 および Fig. 30 に示されるように各 S H 化合物に関して顕著な相関性が認められる。

これらの事実は、ペニシラミンキレートにおけるカルボキシル基からの配位の弱い金属ほど、混合配位子キレートを形成し易いことを明らかに示している。

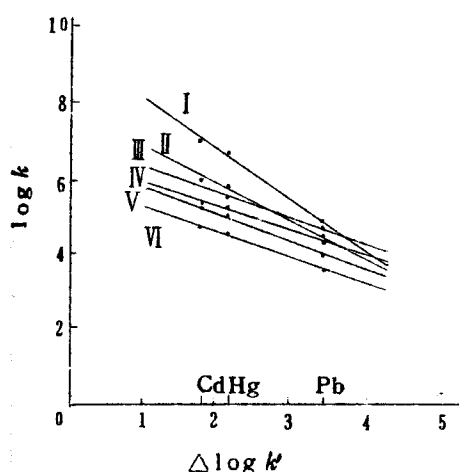


Fig.29. Correlation of Formation Constants of Mixed Ligand Chelates with Differences of Stability Constants between Penicillamine Metal Chelates and Penicillamine Methyl Ester Chelates

- I: 2-mercaptoethylamine
- II: N-acetylpenicillamine
- III: mercaptoacetic acid
- IV: glutathione
- V: penicillamine methyl ester
- VI: α -mercaptopropionyl glycine

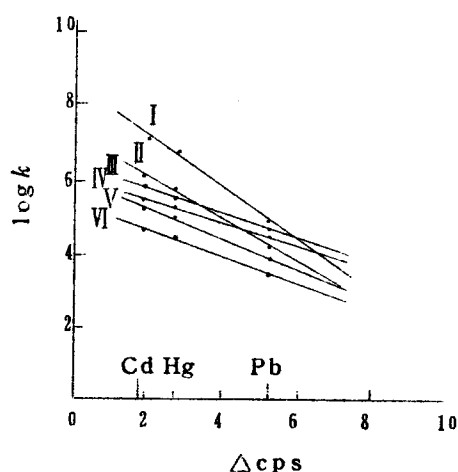
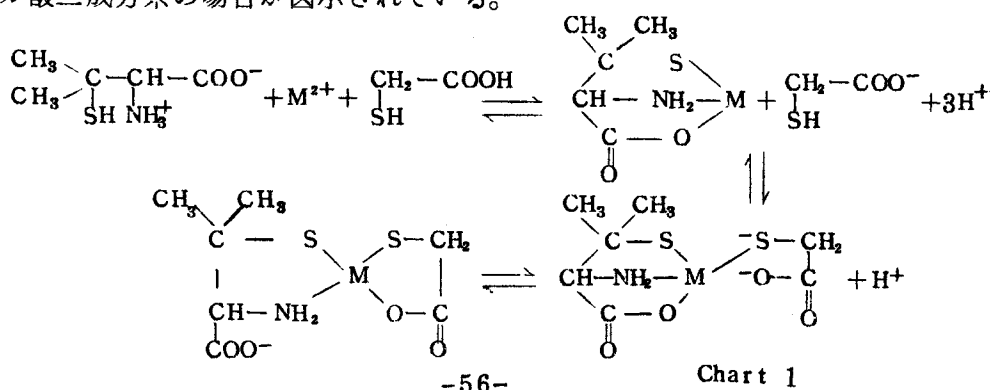


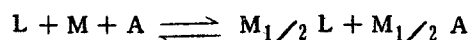
Fig.30. Correlation of Formation Constants of Mixed Ligand Chelates with Differences of Chemical Shift of Methine Proton between Penicillamine Metal Chelates and Penicillamine

- I: 2-mercaptoethylamine
- II: N-acetylpenicillamine
- III: mercaptoacetic acid
- IV: glutathione
- V: penicillamine methyl ester
- VI: α -mercaptopropionyl glycine

以上のような実験結果を基にして、本混合配位子系に対して次のような反応機構が考察される。まず酸性から中性にかけては、primary 配位子のキレートのみが生成し、これが非常に安定であることはペニシラミンキレートの高い生成定数からも明白である。しかし中性からアルカリ性にかけて secondary 配位子の S H 基が解離して $-S^-$ になると、ペニシラミンキレートの中心金属を攻撃しはじめる。ペニシラミンは、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} あるいは Cd^{2+} に対して三座配位子として作用し、しかもこれら硫化水素族の金属は、イオウ原子と極めて親和性が高く、強く共有結合している。そのため金属から配位子の方へ電子が移動するので、中心金属は幾分正の電荷 (δ^+) を帯びていると推定される。このような状態において secondary 配位子の $-S^-$ がペニシラミンキレートの中心金属を攻撃し、結合する。ついで、ペニシラミンのカルボキシル基—金属の弱い結合が解離し、この空いた配位座を secondary 配位子のもう一方の配位基 (カルボキシル基やアミノ基) が占有して、最終的には Chart 1 に示すような二つのキレート環をもった混合配位子キレートが生成されることが考えられる。このことは、エチルメルカプタンのようなこれら金属に対して一座配位子として作用するような secondary 配位子では同様な混合キレートの生成が観察されなかったこと、および本混合配位子キレートの生成定数と primary キレートのカルボキシル基からの配位の強さとの間により相関性が認められることなどから支持されるであろう。なお、Chart 1 にはペニシラミン—金属—チオグリコール酸三成分系の場合が図示されている。



グリシンやヒスチジンのようなS H基を含まない配位子では、ペニシラミンとの混合配位子キレートの生成は認められず、またNi キレートやZn キレート系においては、



なる反応が観測された。これは、 Ni^{2+} や Zn^{2+} の場合には非常に配位子：金属＝2：1のキレートを生じ易いためであろうと考えられる。事実、ペニシラミンをはじめペニシラミンメチルエステルやN-アセチルペニシラミンのNi およびZn キレートの生成定数（Table IV参照）を見てみると、 k_1 と k_2 との間の spreading factor (k_1/k_2) は極めて小さく、2対1キレートが安定で立体的にもつくり易いことを示している。

このようにペニシラミンと2対1のキレートを生じ易い Ni^{2+} や Zn^{2+} よりも、1対1のキレートを生成する Hg^{2+} 、 Pb^{2+} および Cd^{2+} の方がS H化合物と混合配位子キレートを形成する傾向がはるかに大きい²⁹⁾といふことは、ペニシラミンが後者の金属の解毒により効果が大きい事実と考え合わせると非常に興味深い。何故ならば、解毒の過程への混合配位子キレートの関与を次のように考えられるからである。体内に沈着したHg、Pb、Cdのような重金属は、生体内のS Hたんぱくや酵素部分あるいはグルタチオンなどと結合していると考えられており、そしてこのような状態においてペニシラミンが作用することになり、この場合は今回の混合キレート系とは異なって、すでにたんぱく金属錯体(MA)が生成しており、これをペニシラミン(L)が攻撃することになる。しかしながら、本検討より明らかなごとく中性付近においてはペニシラミンキレート(ML)の方がはるかに安定に存在するため、次のような反応中間体としての混合配位子キレートの生成を経て、安定なペニシラミンキレートとして体外に排泄されるのではないかと推定される。この点に関しては、第二篇における生体高分子結合重金属イオンとペニシラミンとの相互作用に関する研究にお

いて、さらに詳述する。

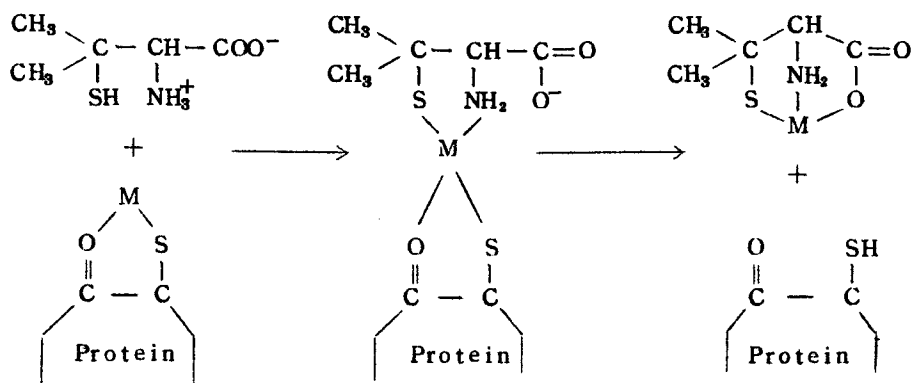


Chart 2

第4章 有害重金属の放射化学的微量定量へのペニシラミンの応用

近年、公害としての重金属中毒の原因追究や微量金属の薬理学的・毒物学的研究の発展に伴って、痕跡金属に対する定量法の必要性が増大している。従来、重金属イオンの定量法としては主としてキレート剤による吸光光度法が行なわれており、また最近では放射化分析法も用いられているが、吸光光度法では感度が十分でない場合が多く、放射化分析法では感度は極めて高いが原子炉など特殊な装置を必要とするなどの難点がある。そこで、ラジオアイソトープによるトレーサー法をキレート剤を用いる種々の分析法とを組み合わせ用いれば、キレート剤の特徴と放射能利用分析の長所とを生かして、より簡便で高感度の分析法が得られることが期待されると考え、主として公害上問題となる重金属イオンについて、重金属類に対し強いキレート生成能を有するペニシラミンをキレート剤とする放射滴定法およびペーパークロマトグラフ分離を利用した準化学量論的同位体希釈分析法の応用を検討した。

第1節 ペニシラミンによる有機 Hg , $Hg(II)$, $Pb(II)$, $Cd(II)$ および $Ni(II)$ の放射滴定

ペニシラミンの $Hg(II)$ や $Pb(II)$ などの重金属に対するキレート生成能が、 $Co(II)$ に対するキレート生成能よりもはるかに大きいことを利用して ^{60}Co を放射性指示薬としたペニシラミンによる微量有機 Hg , $Hg(II)$, $Pb(II)$, $Cd(II)$ などの重金属類の放射滴定法について検討を行なった。また、 ^{203}Hg をトレーサーとする微量 Hg の放射滴定法についても論ずる。

実験方法

試薬および装置：放射性 Co は、Oak Ridge National Laboratory製

の $^{60}\text{CoCl}_2$ の塩酸溶液である。その放射化学的純度は、 γ 線スペクトル特性で確認した。有機 Hg 化合物のうち、ジフェニル水銀については Maynard の方法³⁰⁾によって合成したものを、その他の有機 Hg 化合物については市販品を蒸留水またはエタノールに溶解して使用した。ペニシラミンは、Sigma 社の製品を使用した。その他の試薬は、すべて試薬特級品を用いた。陽イオン交換樹脂は、Dowex 50W \times 8 を常法に従って 2 N の塩酸と 2 N 水酸化ナトリウム溶液でコンディショニングしたのち使用した。また緩衝溶液としては、0.05 M ホウ酸ナトリウム溶液および 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を調製し、これを適当に混合して所定の pH に調節して用いた。使用した水は、一度蒸留したものをさらにイオン交換純水製造装置を通して得られた純水である。 ^{60}Co の放射能強度の測定には、神戸工業製 EA-14 型井戸型シンチレーションカウンターを使用した。

定量操作：数個の共栓付三角フラスコに一定量の試料溶液を入れ、これに放射性 Co 溶液 0.5 ml を添加したのち、ペニシラミン溶液を順次その量を増して加える。pH を緩衝液で 9~10 に調節し、また全量を 10 ml とする。次に陽イオン交換樹脂約 0.1 g を加えたのち、30 分間振盪器でかき混ぜる。反応終了後、上澄液 5 ml をとって、その放射能強度を井戸型シンチレーションカウンターで測定する。

実験結果

有機 Hg 化合物の放射滴定：ペニシラミンの有機 Hg 化合物に対する錯生成能は、 Co(II) に対するそれよりも大きいことが予想され、 ^{60}Co をトレーサーとして有機 Hg 化合物を滴定できることが期待される。そこで 10^{-5} M 有機 Hg 溶液の一定量、 10^{-5} M 放射性 Co 溶液 0.5 ml および 10^{-5} M ペニシラミン溶液を用いて前述の定量操作を行ない、縦軸に溶出液の放射能強度 (cpm) を、横軸に添加ペニシラミン量をとって滴定曲線を作成したところ Figs. 31~37 のような結果が得られた。検討された 7 種の有機 Hg 化合物のうち、phenylmercuric chloride, ethylmercuric chloride,

phenylmercuric acetate, phenylmercuric nitrate, p-chloro-mercuric benzoate および mercuric phenylacetate については、ペニシラミン量が有機 Hg 化合物に対して当量までは溶出液の放射能強度はほぼ一定であるが、当量点を過ぎてペニシラミンが過剰に存在するとペニシラミン Co(II) キレートが溶出するようになり、溶出液の放射能強度は急激に増加し明確な屈折点が見られる。この屈折点までに消費されたペニシラミン量は、存在する有機 Hg 化合物の量によく対応し定量が可能であることがわかった。diphenylmercury については他の 6 種の有機 Hg 化合物とは性質は異なるが、Hg とイオウとの強い親和性により他の場合とは異なった錯生成が行なわれ、その結果あるいは定量が可能ではないかと考え検討を行なったが、diphenylmercury 存在下においても Co 単独の場合の滴定曲線とほとんど同じであり、滴定することは不可能であった。これは、diphenylmercury の立体的因子や難解離性のためペニシラミンとの錯生成能が低下することに起因していると考えられる。

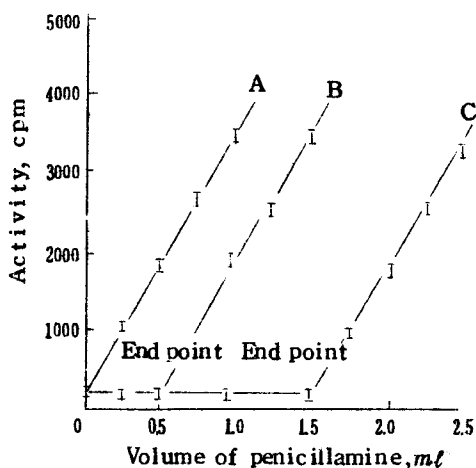


Fig. 31 Titration curves of phenylmercuric chloride using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine

A: 0.50 ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B, C: 0.50, 1.50 ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50 ml of ^{60}Co standard solution

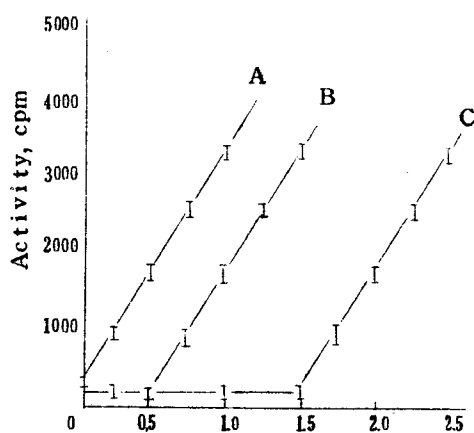


Fig. 32 Titration curves of ethylmercuric chloride using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine

A: 0.50 ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B, C: 0.50, 1.50 ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50 ml of ^{60}Co standard solution

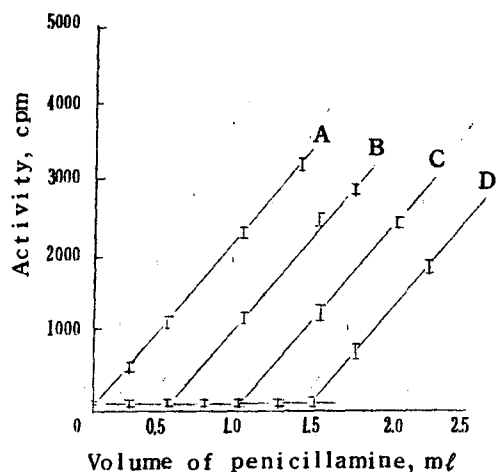


Fig. 33 Titration curves of phenylmercuric acetate using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50 ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B, C, D: 0.50, 1.00, 1.50 ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50 ml of ^{60}Co standard solution

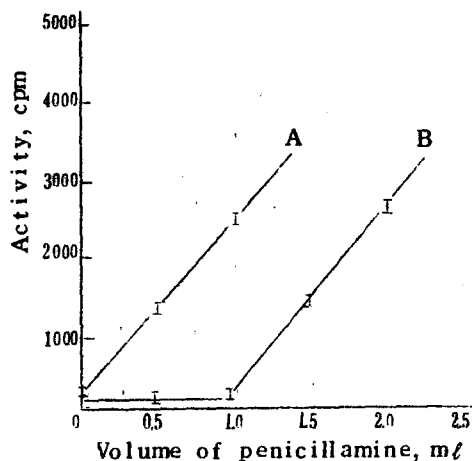


Fig. 34 Titration curves of phenylmercuric nitrate using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50 ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B: 1.00 ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50 ml of ^{60}Co standard solution

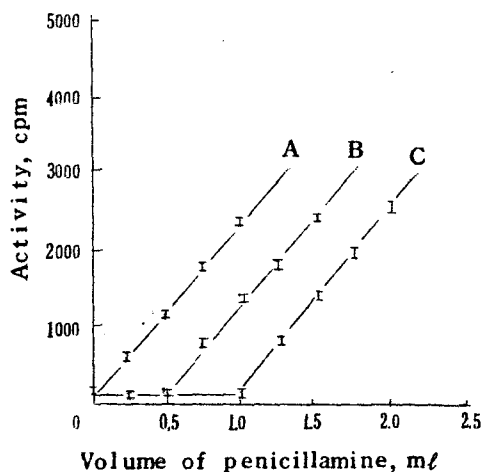


Fig. 35 Titration curves of *p*-chloromercuric benzoate using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50 ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B, C: 0.50, 1.00 ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50 ml of ^{60}Co standard solution

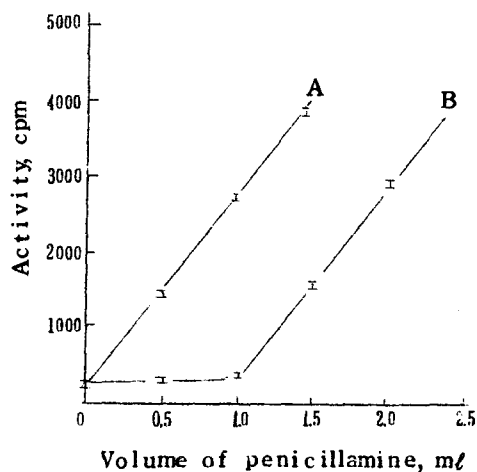


Fig. 36 Titration curves of mercuric phenylacetate using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50 ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B: 1.00 ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50 ml of ^{60}Co standard solution

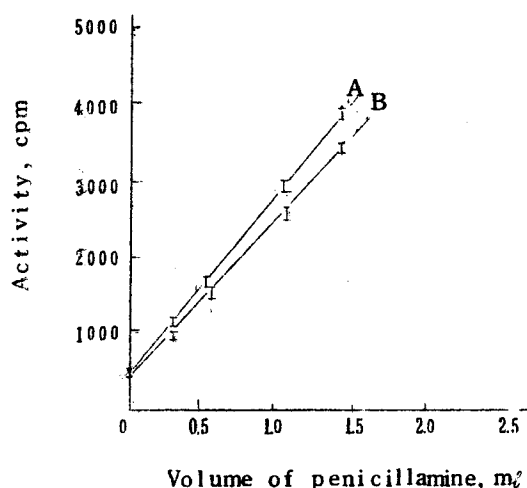
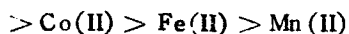
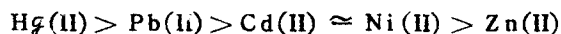


Fig.37 Titration curves of diphenylmercury using ^{60}Co tracer with 10^{-5} M penicillamine
 A: 0.50 ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ ^{60}Co standard solution ;
 B: 1.00 ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ inactive sample solution containing 0.50 ml of ^{60}Co standard solution

Hg(II) , Pb(II) , Cd(II) などの無機重金属イオンの放射滴定：ペニシラミンと種々重金属イオンとのキレート生成反応に関する基礎的検討から，そのキレート化合物の安定度の強さは，次のような順序になることが示された。



この安定度の順序から推察されるように， Co(II) よりも安定度の高い Hg(II) ， Pb(II) ， Cd(II) ， Ni(II) および Zn(II) については， ^{60}Co をトレーサーとして滴定できることが期待される。そこで，この点を検討するため有機 Hg 化合物の場合と同様の操作を行なった。得られた結果を Figs. 38～42 に示した。

安定度の順序から期待されたように， Hg(II) ， Pb(II) ， Cd(II) および Ni(II)

については、明確な屈折点が得られ定量が可能であることがわかった。しかしながら Zn(II) については、 Co(II) 単独の場合と同様の滴定曲線が得られ定量することは不可能であった。これは、希薄溶液中においてペニシラミン Zn(II) キレート生成速度が非常に遅くなるためではないかと考えられた。そこで、 ^{65}Zn を用いてペニシラミンとのキレート生成反応を検討した。すなわち、 Zn(II) とペニシラミンとをモル比で 1 対 1 に混ぜ 1 時間反応させたのち、生成キレートと遊離 Zn(II) イオンとを陽イオン交換樹脂を用いて分離し溶出液の放射能強度を追及したところ、 10^{-3}M 濃度では溶出液の放射能強度の顕著な増加がみられたが、 10^{-6}M 濃度ではほとんど放射能強度は観測されず、やはり希薄溶液中では反応速度が遅くなるのではないかと推定された。

また、安定度の順序から推察されるように Fe(II) や Mn(II) は、 ^{60}Co をトレーサーとして滴定することは困難であると予想されるが、この点についても検討を加えた。その結果は、予想されたように Co(II) 単独の場合の滴定曲線と一致し、これら金属イオンの滴定は不可能であった。

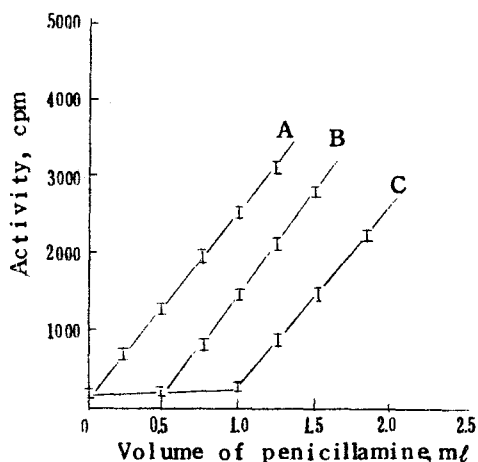


Fig. 38 Titration curves of mercuric chloride using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B, C: $0.50, 1.00\text{ml}$ of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50ml of ^{60}Co standard solution

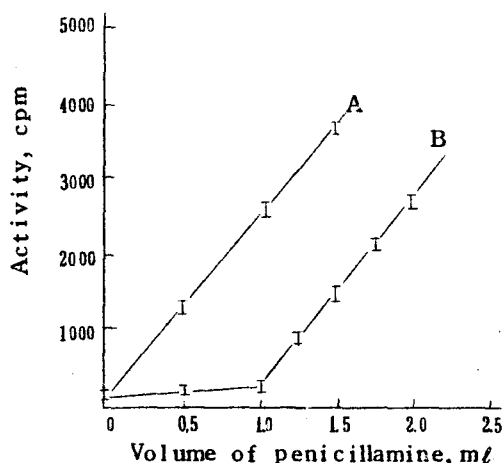


Fig. 39 Titration curves of lead nitrate using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B: 1.00ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50ml of ^{60}Co standard solution

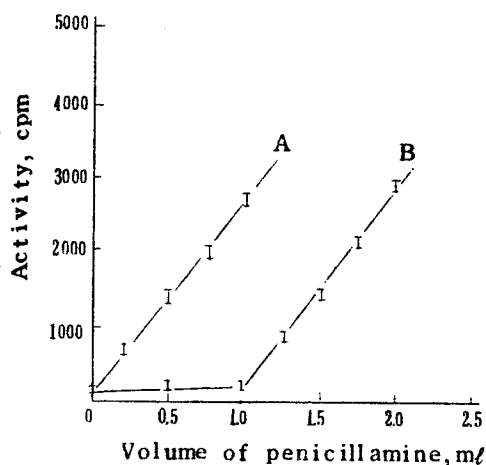


Fig. 40 Titration curves of cadmium chloride using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B: 1.00ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50ml of ^{60}Co standard solution

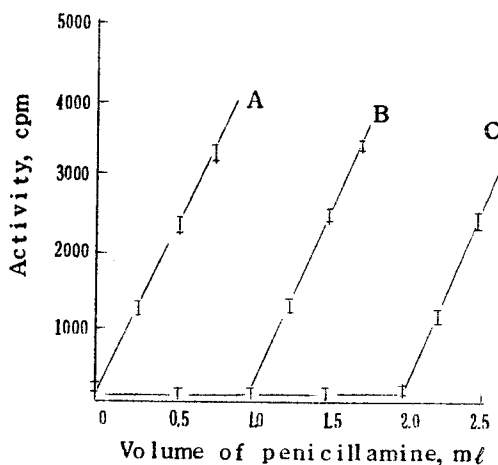


Fig. 41 Titration curves of nickel chloride using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ penicillamine
A: 0.50ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B, C: $0.50, 1.00\text{ml}$ of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50ml of ^{60}Co standard solution

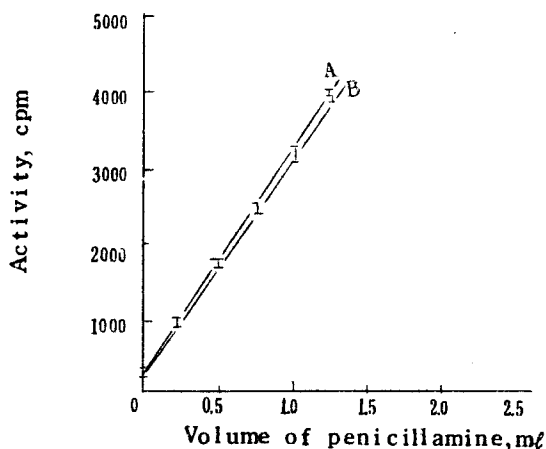
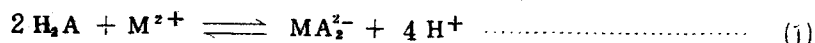


Fig. 42 Titration curves of zinc chloride using ^{60}Co tracer with 10^{-5}M penicillamine
A: 0.50ml of $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ ^{60}Co standard solution; B: 1.00ml of $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ inactive sample solution containing 0.50ml of ^{60}Co standard solution

キレート化合物の組成：滴定曲線において、屈折点までに消費されたペニシラミン量は、金属に対して当量のペニシラミン量を示している。従って、これより各キレート化合物の組成を求めると、Hg(II)、Pb(II)およびCd(II)キレートについては配位子対金属が1対1であり、Ni(II)キレートでは2対1であることがわかる。このことは、ペニシラミンが前者の金属に対しては三座配位子として作用し、また後者の金属に対しては二座配位子として作用しているという基礎的検討の結果とよく一致している。また、ペニシラミンの有機Hg錯体においては、いずれもその組成は明らかに1対1である。

考 察

ペニシラミン金属キレートに関する基礎データを用いて本法の定量限界を考察した。すなわち、本法による定量の限界は、ペニシラミンとCo(II)とのキレート生成反応が低濃度でどの程度進行するかに大きく依存しており、これはキレートの見かけの安定度から判断することができる。いま、ペニシラミンとCo(II)とが(1)式に従って反応する場合を考えてみる。



微量定量であるのでキレート生成反応は99%以上進行すれば満足であるとする、ペニシラミンがCo(II)と反応してキレート化合物 MA_2^{2-} を生成するためには、次のような関係が成り立たねばならない。

$$2 [\text{MA}_2^{2-}] \geq 0.99 \text{C}_{\text{H}_2\text{A}} \quad (2)$$

ただし、 $\text{C}_{\text{H}_2\text{A}}$ はペニシラミンの初濃度

また、Co(II)イオン M^{2+} およびペニシラミンアニオン A^{2-} の濃度は、それぞれ(3)式および(4)式で与えられる。

$$[\text{M}^{2+}] = \text{C}_\text{M} - [\text{MA}_2^{2-}] \div \text{C}_\text{M} - \frac{1}{2} \text{C}_{\text{H}_2\text{A}} \quad (3)$$

ただし、 C_M は Co(II) イオンの初濃度

$$[\text{H}_2\text{A}] = \frac{[\text{A}^{2-}][\text{H}^+]}{K_1 K_2} \leq 0.01 C_{\text{H}_2\text{A}} \quad (4)$$

ただし、 K_1 , K_2 はペニシラミンの酸解離

定数

(2)式、(3)式および(4)式をペニシラミン Co(II) キレート生成定数 K_{MA_2} の式に代入すると(5)式が得られる。

$$K_{\text{MA}_2} = \frac{[\text{MA}_2^{2-}]}{[\text{M}^{2+}][\text{A}^{2-}]^2} \geq \frac{C_{\text{H}_2\text{A}}}{2C_M - C_{\text{H}_2\text{A}}} \cdot \left(\frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2} \right)^2 \quad (5)$$

(5)式において、右辺の第一項 $C_{\text{H}_2\text{A}} / (2C_M - C_{\text{H}_2\text{A}})$ は K_{MA_2} の値に大きな影響を与えないし、また、 $[\text{H}^+]^2 / K_1 K_2$ は十分高い pH 値、すなわち試薬が完全解離する pH 域では 1 に等しい。従って、金属のトレーサー量 ($C_{\text{H}_2\text{A}} \leq 10^{-5} \text{ M}$) の定量には、少なくともキレートの生成定数が 10^{14} 以上でなければならないことが(5)式より求められる。ペニシラミン Co(II) キレートの生成定数は 1.23×10^{16} であるので、この点を満足している。また、この Co(II) キレートの生成定数およびペニシラミンの酸解離定数 8.13×10^{-9} 、 2.82×10^{-11} の値を(5)式に代入すると、 10^{-5} M の試薬で滴定を行なうには少なくとも pH を 8.8 以上にする必要があることがわかる。

以上 ^{60}Co をトレーサーとする滴定法について検討してきたが、同様にして ^{203}Hg をトレーサーとして Hg(II) イオンを滴定することが当然期待される。

この点について、 ^{203}Hg を用いて検討したところ Fig. 43 に示されるように容易に滴定されることがわかった。

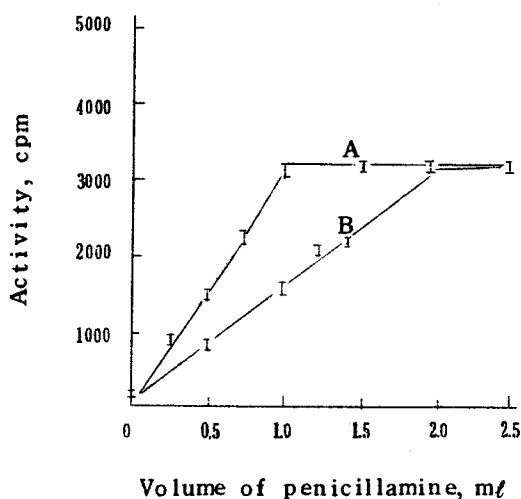


Fig. 4.3 Titration curves of mercuric chloride using ^{203}Hg tracer with 10^{-6}M penicillamine

A: 1.00 ml of $1.0 \times 10^{-6}\text{ M}$ ^{203}Hg standard solution ;

B: 1.00 ml of $1.0 \times 10^{-6}\text{ M}$ inactive sample solution containing 1.00 ml of ^{203}Hg standard solution

従来、重金属類の定量法としてはジチゾンによる吸光光度法が広く実用されているが、特に有機 Hg 化合物などに対して発色の感度が悪く、微量の重金属を定量するには不便な場合があるといわれている。本法では、高い感度が期待され操作が簡単で、特に有機 Hg などの定量には有利であると思われる。また、共存物質の影響を詳細に検討すれば、放射化分析につぐ感度と簡便さを特徴として、生体試料中の有害金属の分析に対して一つの可能性を与えるものと考えられる。³¹⁾

第 2 節 ペーパークロマトグラフ分離による Hg(II) および有機 Hg の 同位体希釈分析

近年、痕跡金属に対する定量法として放射化分析法とともに準化学量論的同位体希釈分析法が急速に発展してきた。³²⁾ これは操作が比較的簡単で、

しかも放射化分析につぐ感度を得られることによっている。前節でペニシラミンを重金属類の放射滴定に用いてよい結果を得たので、さらにペニシラミンをキレート剤とする有機 Hg および Hg(II)の準化学量論的同位体希釈分析をペーパークロマトグラフ分離を利用して検討した。

実験方法

試薬および装置：放射性 Hg は、The Radiochemical Center 製の $^{203}\text{HgCl}_2$ 水溶液を使用し、その放射化学的純度は、 γ 線スペクトロメトリーで確認した。 ^{203}Hg -塩化フェニル水銀は、Nesmejanow³³⁾の方法に従って合成し、その放射化学的純度はペーパークロマトグラフィーによって確認した。ペニシラミンは Sigma 社の製品を使用した。その他の試薬はすべて試薬特級品を用いた。放射性 HgCl_2 標準溶液は、試薬特級の HgCl_2 を精秤し、これに $^{203}\text{HgCl}_2$ の原液を添加して 10^{-4} M 溶液を調製し、EDTA 標準溶液で標定後、蒸留水で適当に希釈して用いた。放射性 $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$ 標準溶液は、合成した $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$ を精秤し、蒸留水に溶解して 10^{-4} M 溶液を調製し、これを適当に希釈して用いた。緩衝溶液 (pH 6 ~ 10) は、0.05 M ホウ酸ナトリウム溶液、0.1 M リン酸二水素カリウムおよび 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を調製し、これを適当に混合して使用した。 ^{203}Hg の放射能強度の測定には、神戸工業製 EA-14 型井戸型シンチレーションカウンタを使用した。

ペーパークロマトグラフ分離：試料溶液の一定量をマイクロピペットを用いて帯状ろ紙 (東洋ろ紙 No. 51A, 2×40 cm) の一端にスポットし、一次元上昇法によって展開する。展開溶媒としては、イソプロピルアルコール：濃アンモニア：水 = 7 : 1 : 2 系を用いた。

放射能分布の検出：展開の終わったろ紙を風乾したのち、ろ紙を 0.5 cm 幅に切りとり、おのおのの切片の放射能強度を井戸型シンチレーションカウンタで測定して、ろ紙上の放射性水銀の分布を求めた。

定量方法：放射性水銀を含む標準溶液の一定量 (水銀の全量を y とする)

に、化学量論的に不足量のペニシラミンを加え、ついで緩衝液を加えて 5 ml とする。室温で 10 分間放置して反応させたのち、この溶液の一定量をろ紙にスポットし、前記溶媒系で展開し生成したキレート化合物と遊離の Hg とを分離し、ペニシラミンに当量のキレート化合物の放射能強度(a_1)を測定する。次に、試料溶液に前記と等量の標準溶液およびペニシラミンを加えて、同様の操作で分離されたキレート化合物の放射能強度(a_2)を測定する。試料溶液中に含まれている水銀の量を x とすると、次の関係が成り立つ。

$$y \times a_1 = (y + x) \times a_2$$

従って、

$$x = y \cdot \left(\frac{a_1}{a_2} - 1 \right)$$

これより、 y が既知ならば分離されたキレート化合物の放射能強度の比 a_1/a_2 を測定することによって、試料溶液中の水銀量 x が算出できる。

実験結果

塩化フェニル水銀の展開分離： 10^{-5} M 塩化フェニル水銀 1 ml に 10^{-5} M ペニシラミン 0.5 ml を加え、ついで緩衝液で全量を 5 ml に希釈する。室温で 10 分間放置後、生成した錯体と遊離の塩化フェニル水銀とをイソプロピルアルコール：濃アンモニア：水 = 7 : 1 : 2 の混合溶媒系で 5 ~ 6 時間展開したところ、Fig. 44 に示すような結果が得られた。生成錯体は溶媒先端に移動し、遊離の塩化フェニル水銀は原点と溶媒先端との中央に移動し、両者の分離は良好である。

塩化第二水銀の展開分離：塩化フェニル水銀の場合と同様に、塩化第二水銀に対して化学量論的に不足量のペニシラミンを加え、生成したキレート化合物と遊離の塩化第二水銀とを同様の溶媒系で展開した結果を Fig. 45 に示した。キレート化合物は原点と溶媒先端との中央付近に移動し、遊離の塩化第二水銀は原点付近にとどまり、両者の分離は良好である。

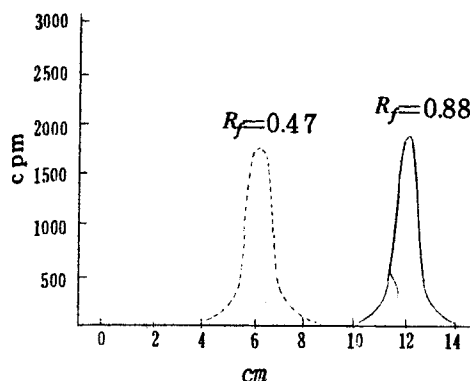


Fig.44 Chromatogram of phenylmercuric chloride and its chelate
 Phenylmercuric chloride band; — Chelate band; [Phenylmercuric chloride] = 2.0×10^{-6} M; [Penicillamine] = 1.0×10^{-6} M

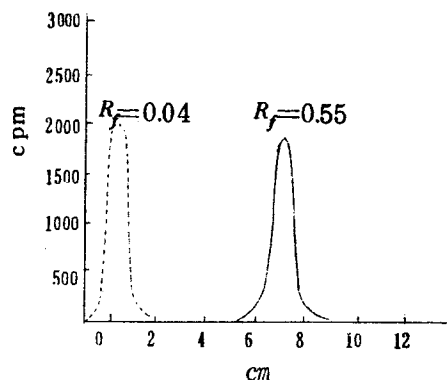
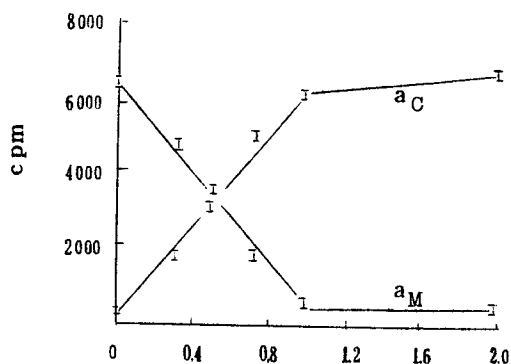


Fig.45 Chromatogram of mercuric chloride and its chelate
 Mercuric chloride band; — Chelate band; [Mercuric chloride] = 2.0×10^{-6} M; [Penicillamine] = 1.0×10^{-6} M

キレート化合物の組成：水銀キレートの組成を検討するためモル比法を行なった。すなわち、 10^{-6} Mの塩化フェニル水銀（放射能強度一定）に対して種々の濃度のペニシラミン溶液を加え、それぞれペーパークロマトグラフ分離を行なったのち、遊離の水銀帯域の放射能強度(a_M)および生成錯体帯域の放射能強度(a_C)を測定した。横軸に塩化フェニル水銀とペニシラミンとのモル比を、縦軸に a_M または a_C の値をとって、その関係をプロットしたところ Fig. 46 に示すように明らかにその組成は、試薬：金属 = 1 : 1である。また、塩化第二水銀に対しても同様の検討を行なった結果、そのキレート化合物の組成も試薬：金属 = 1 : 1であることがわかった。

水銀化合物の同位体希釈分析：ペニシラミンをキレート剤とする塩化フェニル水銀および塩化第二水銀の同位体希釈分析の結果を、Table XおよびTable Yに示した。この結果、数%の誤差で定量できることがわかった。



Molar ratio, $[\text{Penicillamine}] / [\text{Phenylmercuric chloride}]$
 Fig. 46 Molar ratio method
 $[\text{Phenylmercuric chloride}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$

Table X Substoichiometric determination of phenylmercuric chloride

Sample		Standard solution		Activity		Hg found ($\text{g} \times 10^{-6}$)
Inactive Hg added ($\text{g} \times 10^{-6}$)	Active Hg added ($\text{g} \times 10^{-6}$)			a_1 (cpm)	a_2 (cpm)	
3.13	3.13			7784	3872	3.22
2.19	3.13			7784	4661	2.10
1.57	3.13			7784	5241	1.52
0.94	3.13			7784	6046	0.90

Table XI Substoichiometric determination of mercuric chloride

Sample		Standard solution		Activity		Hg found ($\text{g} \times 10^{-6}$)
Inactive Hg added ($\text{g} \times 10^{-6}$)	Active Hg added ($\text{g} \times 10^{-6}$)			a_1 (cpm)	a_2 (cpm)	
2.01	2.01			9327	4741	1.94
1.41	2.01			9327	5422	1.45
1.01	2.01			9327	6333	0.95
0.60	2.01			9327	7101	0.63

共存イオンの影響：ペニシラミンを用いる塩化第二水銀の同位体希釈分析において、 H^2Cl_2 と共存する Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} および Fe^{2+} 各イオンの影響について検討した。その結果を Table XII に示した。一般に、添加した水銀量に対する妨害は、数%以内で大きな妨害とはならないが、そのなかで Cu^{2+} の妨害がやや大きかった。

Table XII Effect of diverse ions

Other metals	Added as	Other metals present ($\text{g} \times 10^{-6}$)	Activity		Inactive Hg found ($\text{g} \times 10^{-6}$)
			a_1 (cpm)	a_2 (cpm)	
—	—	—	6154	3175	1.89
Ni^{2+}	Sulfate	5.87	6154	3114	1.97
Zn^{2+}	Chloride	6.54	6154	3209	1.85
Cu^{2+}	Chloride	6.35	6154	2916	2.23
Pb^{2+}	Nitrate	20.7	6154	3009	2.10
Co^{2+}	Chloride	5.89	6154	3153	1.91
Fe^{2+}	Sulfate	5.58	6154	3051	2.05

Inactive Hg added : 2.01×10^{-6} g ; Active Hg added : 2.01×10^{-6} g

本同位体希釈分析法は、ペーパークロマトグラフィーによって遊離の金属と生成キレート化合物とを分離するので定量操作が非常に簡便であり、しかも数%の誤差で容易に 10^{-6} g 程度の水銀を定量できる利点があり、なお比放射能の高い標識化合物が得られれば原理的にさらに感度を向上させることができるはずである。この節では、有機 Hg 化合物の定量例として ^{203}Hg で標識できる塩化フェニル水銀の場合を示したが、 ^{203}Hg 標識化合物の得られにくい有機 Hg 化合物に対しては本法の応用は困難であり、その場合には前節の放射滴定法が有用である。

第二篇 生体高分子結合重金属イオンとペニシラミンとの 相互作用に関する研究

第1章 たんぱく結合 ^{203}Hg , $^{115\text{m}}\text{Cd}$ および ^{65}Zn と キレート剤との相互作用

キレート剤による生体からの有害金属の解毒除去反応には、低分子キレート剤と金属イオンとの相互作用（錯生成反応）として理解しうる面と、そのような低分子単一レベル系での一般的説明では理解しえない面とがある。 Hg , As , Pb , Bi などの重金属が、生体内で生物学的活性の高い SH 基と結合することによって、種々の機能を阻害することはよく知られている。従って、ペニシラミンの解毒機構を解明する上でも、また優れた解毒剤を開発する上でも生体内 SH 基含有配位子との競合的錯生成反応を理解することは重要であり、中でもたんぱく質の SH 基に結合した重金属イオンとペニシラミンとの相互作用の検討は、この種の研究にとって極めて興味ある課題である。しかもこのような高分子レベルでの検討は、低分子レベルでの錯生成反応と個体レベルでの臨床実験結果との間の相関性をより詳細かつ明確にするために重要であると考えられる。さらに、一般にたんぱく質と低分子化合物との相互作用の原因には、静電結合、水素結合、*van der Waals* 力、疎水結合などがあげられるが、多価金属イオンの場合には高分子中の官能基と直接結合（配位結合）した錯体をつくり、この場合金属イオンに一つの官能基だけが結合した単純な錯体もあるが、金属イオンに一つの高分子がいくつかの官能基で結合してキレート環をつくることもある。キレート環生成は、エネルギー的には非常におこり易い反応なので金属イオンをより安定な構造の錯体にするため、高分子は大きく変形することになる。従って、生体高分子--金属キ

レート剤三成分系での相互作用に関する検討は、生体高分子の機能や構造化学的な面からも興味をもたれ、生体系における解毒除去系のモデルとして極めて有用であると考えられる。このような観点から、まず数種の生体たんぱく質に結合した $Hg(II)$ 、 $Cd(II)$ 、 $Zn(II)$ および $Co(II)$ と若干のキレート剤との相互作用を平衡透析法を中心に検討した。

第1節 金属イオンの関数、キレート剤の関数およびたんぱく質の関数としての金属除去効果

ペニシラミンを中心とするキレート剤による生体高分子からの ^{203}Hg 、 ^{115m}Cd 、 ^{65}Zn および ^{60}Co の除去反応を追究した。生体高分子としては、血清アルブミン(牛)、ヘモグロビン(牛)およびミオグロビン(馬)の三種を用いたが、このうち血清アルブミンとヘモグロビンとはその分子中に反応活性な SH 基を有するのに対し、ミオグロビンはその分子中に SH 基および $S-S$ 基をもっていないという点で大きく相異している。またキレート剤としては、ペニシラミンおよび N -アセチルペニシラミンなどの SH 化合物と $EDTA$ や $DTPA$ のようなアミノポリカルボン酸類を使用し、両者について比較検討を行なった。

実験方法

試薬：高比放射能を有する ^{203}Hg 、 ^{115m}Cd 、 ^{65}Zn および ^{60}Co は、いずれも金属塩化物の水溶液の形で日本放射性同位元素から入手した。 ^{14}C -システインは、The Radiochemical Center から購入した。牛血清アルブミンおよび馬心臓ミオグロビンの結晶はSigma社の製品を、また牛ヘモグロビンの結晶はMann Research Laboratories の製品を使用した。血清アルブミンおよびヘモグロビンの純度は、吸収スペクトルと電気泳動によって確認した。DL-ペニシラミンおよび N -アセチルペニシラミンは第一篇第1章で記述した製品を、そして $EDTA$ 、 $DTPA$ 、 NTA および IDA は市

販の試薬特級品を用いた。緩衝溶液には、ミハエリス緩衝液（ $1/30\text{ M Na}_2\text{HPO}_4 - 1/30\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ ）を使用した。

平衡透析法：生体たんぱく質 $5.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ に当モル量の放射性金属を含む金属イオン標準溶液を加え、ミハエリス緩衝液（ $\text{pH } 6.9$ ）で全量を 10 ml にしたのち、Visking のセルロースチューブに入れ、これを 50 ml のキレート剤を含む緩衝溶液が満たされている二頸の透析容器に浮遊させる。キレート剤としては、ペニシラミン、N-アセチルペニシラミン、EDTA、DTPA、NTA および IDA を各々 $1.0 \times 10^{-3}\text{ M}$ 濃度で使用した。対照溶液としては、キレート剤を含まない同じ緩衝液を用いた。一定時間毎に透析液 3 ml をとってウエル型シンチレーションカウンターで ^{203}Hg 、 $^{115\text{m}}\text{Cd}$ 、 ^{65}Zn あるいは ^{60}Co に基づく γ 線放射能強度を測定し、これよりたんぱく質から除去された金属量を算出した。 ^{203}Hg および $^{115\text{m}}\text{Cd}$ の場合には半減期による補正を行なった。

ゲルろ過法：たんぱく質からの金属イオン除去に対する反応機構を調べるため、セファデックス G-25 によるゲルろ過法を利用し、中間錯体の生成を確認するためキレート剤として ^{14}C -システインを用いた。セファデックス G-25 をミハエリス緩衝液（ $\text{pH } 6.9$ ）で平衡にし、ついで $2.0 \times 30\text{ cm}$ のカラムを調製した。カラムの検量は、 ^{203}Hg -システインキレートおよび ^{203}Hg -血清アルブミン錯体によって、あらかじめ放射化学的に行なった。金属イオンとたんぱく質とを反応させ、その溶液に ^{14}C -システインを加え、ただちに反応混合液の一部をカラムに流し、ついで $\text{pH } 6.9$ の緩衝液で溶出した。 1 ml ずつ集められた各溶出液の放射能強度を測定し、溶出曲線を作成した。血清アルブミン濃度の定量には波長 $278.5\text{ m}\mu$ における吸光度を測定し、また ^{14}C -システインに基づく β 線放射能強度の測定には 2-フェニルエチルアミントルエン混合溶媒を用いる液体シンチレーションカウンター（Beckman LS-233 型）を用いた。

結果と考察

生体高分子からの金属除去は、キレート剤濃度に依存している。たとえば、血清アルブミンから除去される $Hg(II)$ の最大量と除去速度とはペニシラミン濃度が低下すると小さくなる。 $5.0 \times 10^{-5} M$ の血清アルブミン—水銀錯体に対して $5.0 \times 10^{-3} M$ ペニシラミンでは 91.4% の $Hg(II)$ が移動し、 $5.0 \times 10^{-4} M$ および $5.0 \times 10^{-5} M$ ペニシラミンでは、それぞれ 86.6% および 38.5% の $Hg(II)$ が移動することがわかった。従って、以下の実験には $Hg(II)$ に対して 20 倍量のキレート剤を使用した。また平衡透析を行なったのち、セルロースチューブの外部溶液の一部をとってペーパークロマトグラフィー（展開溶媒系—イソプロピルアルコール：濃アンモニア：水 = 7 : 1 : 2。詳細は第一篇第 4 章を参照）を検討した結果、 $R_f = 0.5$ 付近に明確な放射能帯域が検出された。このことは、ペニシラミン $Hg(II)$ キレートの形で移動していることを明らかに示している。

ペニシラミン、N-アセチルペニシラミン、EDTA および DTPA による血清アルブミンからの $Hg(II)$ および $Zn(II)$ 除去の時間過程を Fig. 47 と Fig. 48 に示した。

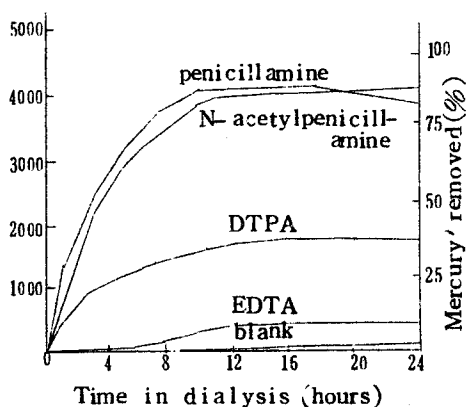


Fig. 47 Equilibrium dialysis in removal of mercury bound to bovine serum albumin by chelating agents.

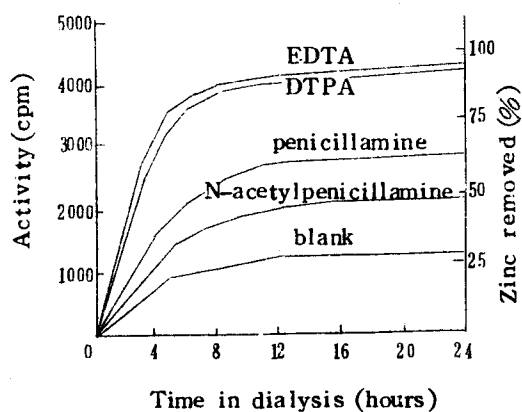


Fig. 48 Equilibrium dialysis in removal of zinc bound to bovine serum albumin by chelating agents.

キレート剤によって除去される金属の速度と量の両方において、著しく異なっていることが観察される。たとえば Hg(II) の場合では、ペニシラミンや N-アセチルペニシラミンによってアルブミンに結合した Hg(II) の 86.6% および 86.4% が除去されるのに対し、EDTA および DTPA ではそれぞれ 7.9% および 35.1% の Hg(II) しか移動しない。一方、Zn(II) の場合には、キレート剤特異性の点で Hg(II) の場合において観察された結果と著しく相異し、金属移動効果は DTPA \approx EDTA > ペニシラミン > N-アセチルペニシラミンの順に低下している。

ペニシラミン、N-アセチルペニシラミン、EDTA および DTPA による数種の生体たんぱく質からの Hg(II)、Zn(II) および Cd(II) 除去に対して得られた透析データを Table XIII と Table XIV に要約した。なお、たんぱく質-Co(II) 錯体は解離が大きく、本法によってはキレート剤による Co(II) 除去の効果を議論することは困難であった。

Table XIII Ability of chelating agent in removal of mercury bound to protein by dialysis

Chelating agents	Total mercury removed (%)							
	Albumin		Hemoglobin		Myoglobin			
—	a)	1.2	a)	0.6	b)	1.3	a)	4.1
Penicillamine		86.6		76.3		78.7		93.7
N-Acetylpenicillamine		86.4		80.4		82.2		95.5
EDTA		7.9		0.5		4.4		13.3
DTPA		35.1		3.1		30.7		82.1

a) One mole of mercury was added to 1 mole of protein.

b) Two moles of mercury was added to 1 mole of protein.

Table XIV Ability of chelating agent in removal of
cadmium or zinc bound to protein by dialysis

Chelating agents	Total cadmium removed(%)		Total zinc removed(%)	
	Albumin	Hemoglobin	Albumin	Hemoglobin
—	34.7	36.3	29.1	10.7
Penicillamine	92.8	93.2	60.7	43.9
N-Acetylpenicillamine	77.0	85.2	48.5	32.0
EDTA	96.3	97.6	97.7	92.9
DTPA	96.0	98.1	96.7	90.2
IDA	50.6	53.1		
NTA	77.3	77.9		

同じ四種のキレート剤に対するヘモグロビンおよびミオグロビン金属錯体の透析は、キレート剤特異性の点で血清アルブミンにおいて観察されたと類似の結果を示している。また、たんぱく質の種類によるHg(II)の除去は、ミオグロビン>血清アルブミン>ヘモグロビンの順序に減少しているのが観察される。これは馬のミオグロビンは血清アルブミンやヘモグロビンのようにその分子中にシステインおよびシスチン残基を含まない³⁵⁾ので、遊離のチオール基によってHg(II)錯体を形成する血清アルブミンやヘモグロビンよりもそのHg(II)錯体の安定性ははるかに低いと予想され、それ故ミオグロビンからは容易にHg(II)が移動するものと考えられる。特に血清アルブミンやヘモグロビンの場合において、効果が小さかったDTPAにおいて著しいHg(II)除去効果が見られるのは興味ある現象である。しかしながら、DTPAと類似の構造を有するEDTAの効果は、ミオグロビンの場合にも小さかった。類似の現象は、ヘモグロビンに2モルのHg(II)を添

加した場合にも認められる。この場合、1モルは活性なシステイン残基のS H基と結合するが、2モル目のHg(II)はS H基以外の他の部位(ヒスチジン残基や末端アミノ基など)で錯体を形成すると考えられるが、これに対するEDTAとDTPAとの効果には大きな相異が見られ、高次構造を有するたんぱく質とキレート剤との相互作用においては、低分子化合物の立体構造もまたその反応性に大きな影響を与えていることを予想させる。DTPAとEDTAとの反応の相異には、DTPAにおける第五番目のカルボン酸の関与が推定される。

第2節 金属除去率とキレートの生成定数との相関性

血清アルブミン、ヘモグロビンおよびミオグロビンに結合したHg(II)、Zn(II)あるいはCd(II)に対する数種のキレート剤の除去効果には、キレート剤のタイプで著しい相異が観察された。たんぱく質中のチオール基に強く結合しているHg(II)の移動には、ペニシラミンやN-アセチルペニシラミンのようなS Hキレート剤が大きな効果を示したのに対し、EDTAやDTPAのようなアミノポリカルボン酸類の効果は著しく小さかった。EDTAおよびDTPAのHg(II)に対する結合能(生成定数 $\log k$)は、それぞれ21.8および27.0³⁶⁾であり、ペニシラミンやN-アセチルペニシラミンのそれは16.4および14.2(概算値)であり、前者の方が大きいことから考え、これらキレート剤によるたんぱく質からの水銀除去能は、金属に対する結合能に一義的に依存していないことがわかる。EDTAやDTPAのHg(II)キレートは、平衡論的には安定であるが、たんぱく質-Hg(II)錯体との間の一種の配位子交換反応が不活性であると考えられ、従ってキレート剤による生体高分子からのHg(II)の除去は、錯体のstabilityよりもむしろ交換反応のlabilityに支配されているのではないかと考えられる。

Zn(II) の場合をみると、キレート剤による除去効果は血清アルブミンおよびヘモグロビンの場合とも、EDTA \approx DTPA>ペニシラミン>N-アセチルペニシラミンの順に減少し、しかもたんぱく質から除去された Zn(II) 量(亜鉛除去率)とこれらキレート剤の Zn(II) キレートの条件的生成定数との間には、Fig. 49に見られるようによい直線性が存在する。この事実、キレート剤による生体高分子からの Zn(II) の除去はもっぱらキレート剤と Zn(II) との結合能に依存していることを示唆している。Zn(II) の場合には、おそらく血清アルブミンやヘモグロビン中のヒスチジン残基が結合に参与し、チオール基は関与していないと考えられる³⁷⁾。従って、たんぱく Zn(II) 錯体はたんぱく Hg(II) 錯体に比較して弱く、また金属をとりまくたんぱく分子の立体環境も異なるので、キレート剤との相互作用にも差違が生ずると予想される。

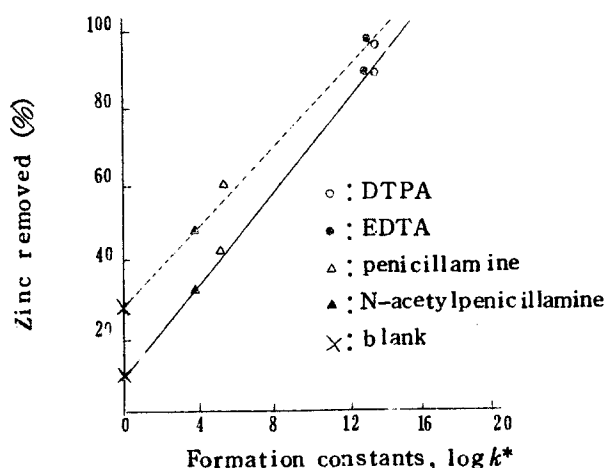


Fig. 49 Correlation of formation constant of zinc chelate and ability of chelating agent in removal of zinc bound to protein by dialysis.

— : hemoglobin, ... : serum albumin

* $\log k = \log K' - \text{pH} + \text{pK}_a$; $\log K'$: overall formation constant of chelate, pH: pH of dialytic solution, pK_a : acid dissociation constant of ligand

さらにCd(II) の場合には, Fig. 50 のようにS Hキレート剤とアミノポリカルボン酸類とでのおのの別個にCd(II) 除去率とキレートの条件的生成定数との間により相関性が認められた。同じ生成定数を有するキレート化合物において, アミノポリカルボン酸類よりもS Hキレート剤の著しいCd(II) 除去効果は, 金属キレートにおけるイオウ—Cd(II)間の π 結合の寄与に依存していると考えられる³⁸⁾。事実, イオウ原子のCd(II) に対する親和性は, Hg(II) やPb(II) とともに高いことがよく知られている。

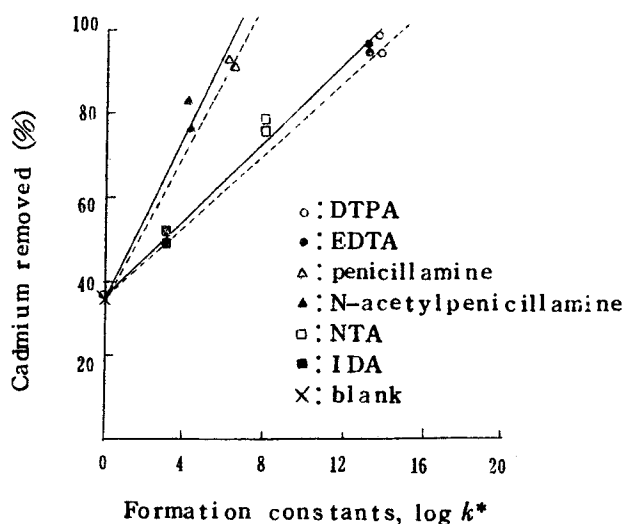


Fig. 50 Correlation of formation constant of cadmium chelate and ability of chelating agent in removal of cadmium bound to protein by dialysis.

—: hemoglobin, ...: serum albumin

* $\log k = \log K' - \text{pH} + \text{pK}_a$; $\log K'$: overall formation constant of chelate, pH: pH of dialytic solution, pK_a : acid dissociation constant of ligand

上述の観察は, Hg(II) がS Hたんぱく質や酵素に沈着した慢性中毒に対して, アミノポリカルボン酸類では効果がうすくペニシラミンやN-アセチルペニシラミンでは効果がみられるという臨床結果, あるいは生体内の

Zn(II)の除去に対しては逆にアミノポリカルボン酸類の効果がS Hキレート剤のそれよりも優っているという臨床データとよく対応している。このことは、重金属中毒の解毒除去に関する研究を行なう上で高分子レベルでの検討が、極めて有用であることを暗示しているであろう。

第3節 キレート剤によるたんぱく結合金属からの金属除去機構

最近、生体内における金属イオンの輸送過程においては、高分子錯化剤すなわちたんぱく質と低分子錯化剤とが共に関与した三重錯体の生成が、本質的な段階であることが暗示されている。³⁹⁾また、低分子レベルでの研究として第一篇第3章において記述したように、ペニシラミンと他のチオール基を含むキレート剤とが関与した混合配位子 Hg(II), Pb(II) およびCd(II) キレートの生成を確認した。これらの結果に基づいて、キレート剤によるたんぱく金属錯体からの金属除去過程には中間錯体としてキレート剤、たんぱく質そして金属イオンが含まれた三重錯体の生成が強く予想された。そこで中間体としての三重錯体の存在を証明するため、ゲルろ過法を用いて第1節に記載した実験方法により、血清アルブミン—Hg(II)—¹⁴C—システイン系において検討した。ペニシラミンの放射能標識は非常に困難であるので、この検討には¹⁴C—ペニシラミンの代わりに¹⁴C—システインを使用した。Hg(II) 移動に対するシステインの効果は、ペニシラミンの効果と異なっているが、両化合物の構造は極めて類似しており、二つのキレート剤においてはその反応機構は同じであると考えられる。血清アルブミン—Hg(II)—¹⁴C—システインおよび血清アルブミン—²⁰³Hg(II)—システイン三成分系での放射能パターンを比較した。血清アルブミン—Hg(II)—¹⁴C—システイン系においては、¹⁴C—システインに基づくβ線放射能強度は、Fig. 51に見られるように高分子分画(血清アルブミン分画)にも明確に存在している。一方、Hg(II) を含まない血清アルブミン—¹⁴C—システイ

ンニ成分系における類似の実験では、アルブミン分画の ^{14}C -システインに基づく放射能強度は、極めて小さくほとんど無視しうる程度である。また、アルブミン— Hg(II) — ^{14}C -システイン系とアルブミン— $^{203}\text{Hg(II)}$ —システイン系において、ほとんど同じような溶出曲線が得られることがその放射能追跡より明らかにされた。

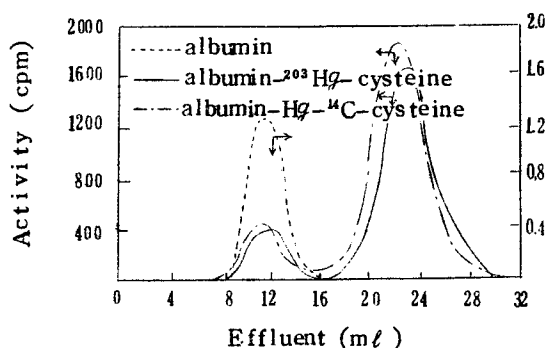
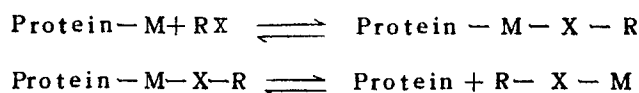


Fig. 51 Separation of ternary complex (albumin-Hg-cysteine) by gel-filtration. concentration of mercury complex of albumin: $5 \times 10^{-4}\text{M}$, concentration of ^{14}C -cysteine: $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$

これらの実験事実は、血清アルブミン、 Hg(II) そしてシステインを共に含む三重錯体がこの系において存在していることをより直接的に示していると考えられる。それ故三重錯体は、金属除去における中間錯体と考えるのが妥当であろう。従って、一般にキレート剤(RX)によるたんぱく金属錯体(Protein-M)からの金属除去に対して、次のような反応機構が推定される。



すなわちキレート剤は、たんぱく金属錯体と反応して三重錯体を形成し、ついでこれが、たんぱく質と低分子キレートに解離する。そして低分子キレートは、高分子錯体すなわちたんぱく金属錯体に比較してはるかに容易に生体膜を通過すると考えられるので、金属は低分子キレート化合物として排泄されると推定される。もちろん、生体膜の通過性を詳細に論ずるには分子の大きさの他、電気的ポテンシャル、化合物のリポイド性および親水性、あるいは生体膜の能動輸送や受動輸送能率などの諸因子を考慮しなければならないであろう。

第2章 SH基含有キレート剤によるヘモグロビン結合

有機HgおよびHg(II)の除去反応

前章において、たんぱく質に結合した種々の金属イオンとペニシラミンとの相互作用の検討結果をのべたが、その中でペニシラミンの解毒作用との関連性において、Hgとペニシラミンとの反応に対して最も興味をもたれた。従来、Hg化合物の応用的研究に比較してその毒性に関する研究は遅れていたが、近年Hg化合物による中毒事故が相いついで起こり、次第に毒性に対する関心が高まってきた。最近、Hg(II)および有機Hg化合物の生体内挙動が追究され、ラットを用いた実験においてHg化合物とくにアルキルHg化合物は、主として血液、肝臓および腎臓に分布すること、そして血液中のHgは、ヘモグロビン分子中のSH基と結合した状態で長期間、高濃度で存在していることが明らかにされた。⁴⁰⁾さらに、クロールメロドリンやネオヒドリンのような医薬品を放射性Hgでラベルした臓器診断薬は放射性医薬品として繁用されているが、その赤血球との反応がHg化合物の毒性ならびに放射線被曝との関連から問題となってきている。⁴¹⁾ヘモグロビン一分子中のシステイン残基に基づくSH基数は、ウシ4モル、ウマおよびヒト6モル、そしてヒツジおよびイヌ8モルと種族によって変動するが、いずれもそのヘモグロビン分子中のシステイン残基のうちでHgと結合するのはβ鎖の93番のもののだけで、他は変性するまでかくれていて反応不活性であることが知られている。β鎖の92番のヒスチジンが中心鉄(ヘム鉄)に結合しているので、β鎖の93番のシステインにHgが結合するとヘモグロビンと酸素との親和性が変化し、その正常な機能がそくなわれると考えられる。また、ヘモグロビンがその構造を維持する上でSH基が重要であることは、ハインツ小体(赤血球内異常顆粒)を伴う異常ヘモグロビンにおいて、β鎖の93番目のシステイン残基のSH基がブロックされている事実から暗示される。⁴²⁾このように

Hg などの有害物によりヘム鉄以外にグロビン部分の S H 基がブロックされればヘモグロビンの変性が急速に進行し、天然ヘモグロビンとしての生理機能を喪失することはもちろん、不溶性ともなればハインツ小体を形成するに至ると考えられている。

このような背景のもとで、種々の S H 基を含むキレート剤とヘモグロビンに結合した有機 Hg および Hg(II) との相互作用を詳細に検討することを計画した。

第 1 節 Hg 除去におよぼすキレート剤濃度および pH の影響

S H キレート剤によるヘモグロビン結合 Hg の除去反応において、配位子濃度や pH などの環境条件あるいは尿素によるたんぱく質の変性が、Hg 除去にどのような影響を与えるか、また S H 化合物によってヘモグロビンから除去されてくる Hg がどのような種 (species) であるのかについて検討を加えた。

実験方法

試薬：N - アセチルペニシラミン、ペニシラミンメチルエステル、S - メチルペニシラミンおよびペニシラミンジスルフィドは、第一篇第 1 章に記載した方法に従って得た。セレノシステアミンは、 β - ブロモエチルフルイミドとセレノシアン化カリウムとの反応で得られたセレノシスタミンを水素化ホウ素ナトリウムで還元することによって合成した。⁴³⁾ ペニシラミン、システイン、チオグリコール酸、グルタチオン、 α - メルカプトプロピオニルグリシン、メルカプトエタノール、2,3 - ジメルカプト - 1 - ープロパノール、2 - メルカプトエチルアミン (システアミン)、 α - アミノ - β - チオールイソブタン、ホモシステイン、2 - ジメチルアミノエタンチオール、シスタミン、シスチン、エタノールアミン、EDTA および DTPA は、市販品を必要に応じ精製して使用した。L - システイン -

$^{14}\text{C}(\text{u})$ は、The Radiochemical Center から入手し、その比放射能は 18.3 mCi/mM である。 ^{203}Hg (3.5 mCi/mg) は HgCl_2 の水溶液として得られ、脱イオン水で希釈して使用した。牛ヘモグロビンの結晶は、Mann Research Laboratories の製品で、その純度は電気泳動法によって確認した。また $\text{pH } 5.6 \sim 6.9$ の範囲にはミハエリス緩衝液を使用し、そして $\text{pH } 9.2$ に対してはハウ砂緩衝液を用いた。他の試薬は、すべて試薬特級品を使用した。

平衡透析法： $5.0 \times 10^{-5} \text{ M } \text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ もしくは $^{203}\text{HgCl}_2$ を含む $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ヘモグロビン溶液の 10 ml を Visking のセルロースチューブに入れて、温度 $22 \pm 0.5^\circ$ の条件下、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ キレート剤を含む緩衝溶液 ($\text{pH } 6.9$) の 50 ml で透析を行なった。透析後、外部溶液に存在するエチル Hg 化合物あるいは ^{203}Hg の量を定量した。エチル Hg 化合物の定量にはジチゾン比色法を、また ^{203}Hg の定量にはその γ 線放射能強度の測定を行なった。これより、キレート剤によってヘモグロビン Hg 錯体から除去された Hg 量を計算した。

ゲルろ過法：セファデックス G-25 によるゲルろ過法を、ヘモグロビン— Hg —システイン三重錯体の分離に応用した。操作法は第 1 章で記述した方法と本質的に同じである。 ^{14}C -システインを定量するため溶出液各 1 ml の放射能強度を、またヘモグロビンの定量のため波長 $575 \text{ m}\mu$ における吸光度をそれぞれ測定した。ヘモグロビンに基づく呈色を 30% 過酸化水素水を 2 滴添加することによって漂白したのち、 ^{14}C -システインに基づく β 線放射能強度を 2-フェニルエチルアミン—トルエン混合溶媒を用いる液体シンチレーション法によって測定した。³⁴⁾

結果と考察

まず Hg 除去におよぼす配位子濃度の影響をしらべるため、 $\text{pH } 6.9$ の条件下、ヘモグロビン Hg 錯体の濃度を一定にし、配位子としてシステイン濃度を変化させて移動する Hg 量を求めたところ、Fig. 52 に示すように

最初存在するHg 量に対して10倍量の配位子濃度の存在でHg 除去率はほぼ一定に達することがわかった。それ故、以降の実験には20倍量の配位子濃度を使用した。なお本透析は、約15時間で完全に平衡に達することがわかった。

次に、Hg 除去におよぼすpHならびに尿素によるたんぱく質の変性の影響を配位子としてシステインを用いた場合について検討した。その結果をTable XV に示した。

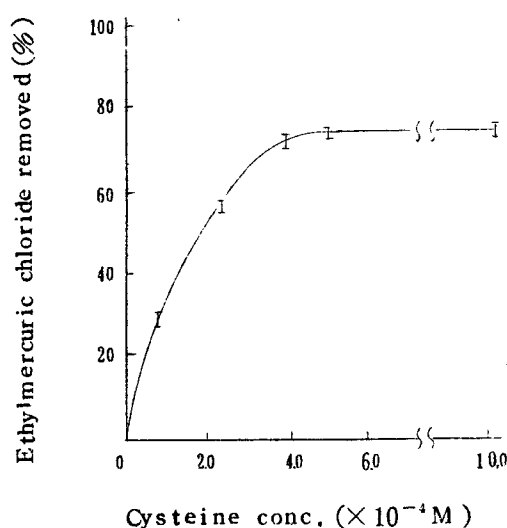


Fig. 52 Effect of concentration of cysteine. Concentration of ethylmercuric chloride: 5×10^{-5} M

Table XV Effect of pH and of denaturation by urea on removal of mercury bound to hemoglobin by cysteine

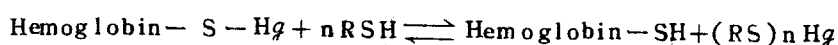
pH	Total C_2H_5HgCl removed(%)		Total $HgCl_2$ removed (%)	
	in absence of cysteine	in presence of cysteine	in absence of cysteine	in presence of cysteine
5.8	6.6	57.0	a) 0.7	a) 86.3
6.9	1.8	75.6	0.4	83.8
9.2	0	36.2	6.7	45.9
b) 6.9	12.2	83.6	3.0	68.7

a) pH 5.6

b) 6M urea was added.

Table XV によれば、pH 6～9 の範囲ではHg(II)の方が有機 Hg よりも幾分除去されやすいのが観察される。pH 9.2 での Hg 除去の減少は、pH 上昇によるヘモグロビンへの Hg 親和性の増大もしくはアルカリ水溶液中でのシステイン自身の化学的安定性の減少—システインの酸化—に基因しているのではないかと考えられる。Hg 除去効果が、生理的 pH 域 (pH 7) においてもっとも高いということは生体からの Hg 除去にとって極めて有利な現象である。6 M 尿素の添加によるヘモグロビン変性下での結果は、非常に複雑で容易に説明することは困難である。

さらに、SH キレート剤によってヘモグロビンから除去される Hg がどのような species であるのかを Schubert らの方法⁴⁴⁾を応用して追究した。すなわち、



なる反応において、配位子濃度 $[\text{RSH}]$ と分配比 K_d との間には、次の式が成り立つ。

$$1/K_d = [\text{RSH}]^n / K_d + 1/K_d^0$$

ここで

$$K_d = \frac{\text{ヘモグロビンに結合した Hg の \%}}{\text{SH キレート剤に結合した Hg の \%}}$$

また、 $[\text{RSH}] = 0$ のとき $K_d = K_d^0$ である。 $[\text{RSH}]^n$ と K_d との間には直線関係が成立するはずであるから、 n に適当な数値を代入して直線となる n の値を求めた。Fig. 53 には配位子としてシステイン、Hg として $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ を用いた場合の結果を示しているが、 $n = 1$ のとき直線となり、このことは、金属：配位子 = 1：1 の組成を有する Hg 錯体の形で移動していることを示唆している。

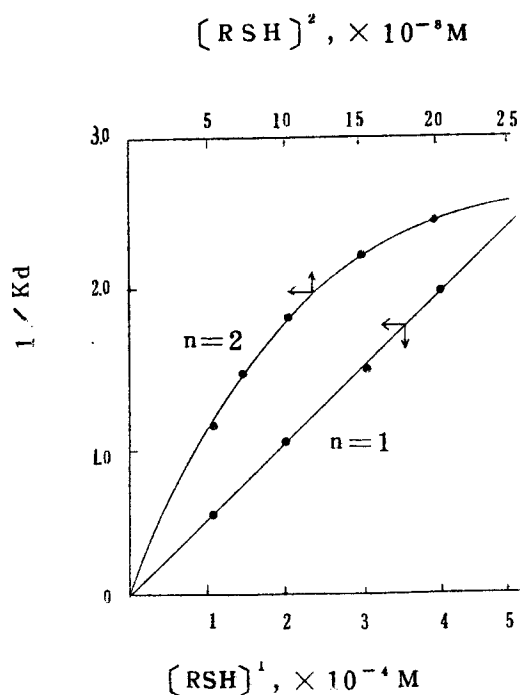


Fig. 53 Equilibration of mercury between hemoglobin and various concentration of cysteine.

第2節 Hg 除去におよぼす種々のSHキレート剤の効果

SH化合物を中心とする種々のキレート剤によるヘモグロビンHg錯体からのHg除去反応をpH 6.9で検討を行なったが、その結果をTable XVIに集約した。

これをみると、遊離のSH基を有する化合物は、有機HgおよびHg(II)に対してともに高いHg除去率を示しているが、SH基がブロックされたメチオニン、S-メチルペニシラミンあるいはシスチンのような化合物、さらには分子中にイオウ原子を含まないEDTAやDTPAのような化合物では非常に小さな効果しか観察されず、たんぱく質からのHg除去には

Table XVI Ability of chelating agent in removal of mercury bound to hemoglobin

Chelating agent	Total C_2H_5HgCl removed (%)	Total $HgCl_2$ removed (%)	Chelating agent	Total C_2H_5HgCl removed (%)	Total $HgCl_2$ removed (%)
—	1.8	0	2-mercaptoethylamine	51.0	77.1
cysteine	75.6	83.8	α -amino- β -thiol-isobutane homocysteine	62.0	80.2
penicillamine	80.4	82.3	2-dimethylaminoethanethiol	68.4	85.0
N-acetylpenicillamine	77.9	88.4	S-methylpenicillamine	46.0	60.8
mercaptoacetic acid	85.7	90.5	methionine	1.7	0.1
glutathione	74.4	81.9	cystamine	0.5	1.5
α -mercaptopropionyl glycine	59.5	85.1	cystine	4.2	1.1
mercaptoethanol	86.4	84.3	DTPA	5.6	0
2,3-dimercapto-1-propanol	56.4	48.8	EDTA	2.4	6.5
penicillamine methyl ester	41.6	82.8		1.8	0.9

遊離の SH 基が必須であることを明確に示している。なお、分子内に 2 個の遊離 SH 基を有する 2,3-ジメルカプト-1-プロパノールの期待に反しての低い Hg 除去効果は、水溶液中において本化合物が極めて不安定であることに起因していると考えられる。検討された種々の SH キレート剤における Hg 除去効果に寄与する諸因子については、次節において記述する。

さらに、Hg 除去におよぼす酸素、イオウおよびセレンのような配位原子の同族置換の影響をエタノールアミン、システアミンならびにセレノシステアミンの 3 種の化合物について追究した。

Table XVII Effect of coordination atom on removal of mercury

X ^{a)}	Electronegativity (Pauling's)	Total C ₂ H ₅ HgCl removed (%)	Total HgCl ₂ removed (%)
O	3.5	1.2	0.4
S	2.5	51.0	77.1
Se	2.4	61.7	57.4

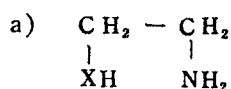


Table XVII に示すように塩化エチル水銀に対する除去効果では、セレノシステアミン>システアミン>> エタノールアミンの順に減少している。この順序は、同族元素（O, S, Se）の電気陰性度の順序とよく対応している。金属の電気陰性度は、配位子のそれに比較して小さい—Hg—の電気陰性度は1.9—から、金属イオンの電荷が過剰に中和されない範囲では、電気陰性度の小さい配位子の方が強い結合をつくることが予想される。一方、塩化第二水銀の場合には、システアミン>セレノシステアミン>> エタノールアミンの順に除去効果が減少している。この場合、システアミンはHg(II)とその分子中のイオウとアミノ基とで配位したキレート形式の配位を好むのに対し、セレノシステアミンではHg(II)に対してもセレンからのみ配位した錯体形式の配位を好むため、有機 Hg と無機 Hg とで異なった効果序列を示していると推定される。このような観察は、セレン原子によるイオウ原子の置換がヘモグロビンに結合した有機 Hg の除去に対して有利であることを示唆している。

第3節 Hg 除去率とキレート剤の SH 基の解離定数との相関性

前節において、ヘモグロビンからの Hg 移動に対するイオウおよびセレン原子の選択的反応性を指摘したが、本節では Hg 除去率と酸解離定数などの物理化学的諸因子との関連性について論ずる。

ヘモグロビンからのエチル Hg の除去率と遊離の SH 基を有する化合物の SH 基の酸解離定数 (pK_{-SH}) との間には、Fig. 54 に示すような興味ある相関性が認められる。すなわち、 pK_{-SH} 値の高い化合物ほど Hg 除去効果も大きく、両者の間にはほぼ直線的関係が成り立っている。しかも、分子内にチオール基の他にカルボキシル基を有する S-O 型の化合物とチオール基およびアミノ基を有する S-N 型の化合物とで、おのおの別個に直線的な相関性が観察された。

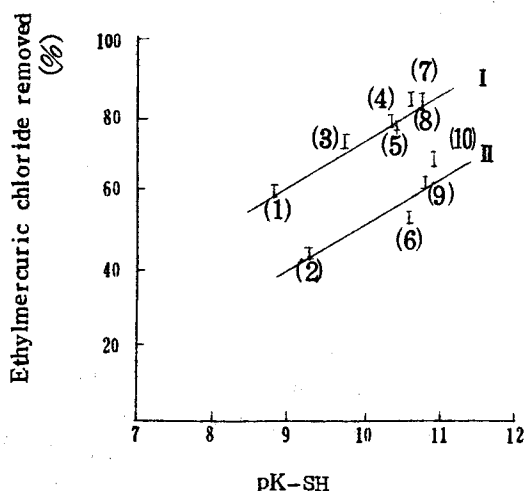


Fig.54 Relationship between removal of ethylmercuric chloride and dissociation constant of chelating agent containing sulfhydryl group.

I: chelating agents of sulfur-oxygen coordination type

II: chelating agents of sulfur-nitrogen coordination type

- (1): α -mercaptopropionyl glycine; (2): penicillamine methyl ester;
 (3): glutathione; (4): N-acetylpenicillamine; (5): cysteine;
 (6): 2-mercaptoethylamine; (7): mercaptoacetic acid; (8): penicillamine;
 (9): α -amino- β -thiol-isobutane; (10): homocysteine

S-N型の化合物，たとえば2-メルカプトエチルアミンによるHg除去率は，そのアミノ基がブロックされた2-ジメチルアミノエタンチオールによる除去率とほとんど同程度であることを考えると，エチルHgの移動にはアミノ基はほとんど関与していないと推定される。これに対してS-O型の化合物においては，対応するS-N型のものに比較して20%程度その除去率が増大しており，このことは，カルボキシル基がHg除去に対して補助的な役割をはたしていることを示唆している。おそらくカルボキシル基は，そのHgへの弱い配位あるいはその静電的性質によってHg除去作用に関与しているのではないかと推定される。

一方，無機Hgの除去率とチオール化合物のSH基の酸解離定数との間の関係をプロットしてみると，Fig. 55に示されるようにHg除去率は，チオール化合物の pK_{-SH} 値に関係なくほとんど一定である。

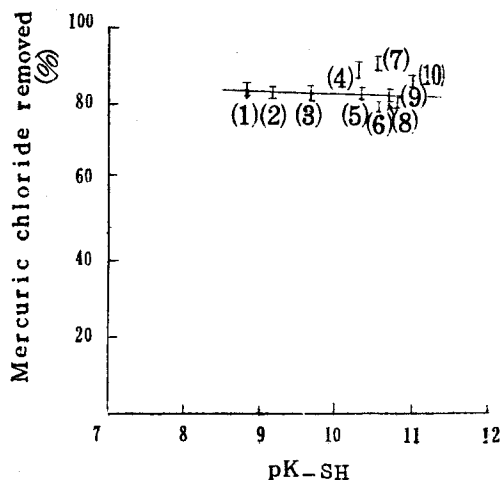


Fig. 55 Relationship between removal of mercuric chloride and dissociation constant of chelating agent containing sulfhydryl group.

- (1): α -mercaptopropionyl glycine; (2): penicillamine methyl ester; (3): glutathione; (4): N-acetylpenicillamine; (5): cysteine; (6): 2-mercaptoethylamine; (7): mercaptoacetic acid; (8): penicillamine; (9): α -amino- β -thiol-isobutane; (10): homocysteine

この場合、S—O型およびS—N型（S—N—O型も含む）の化合物ともにそのHg²⁺除去率は、イオウからの配位のみが考えられる2—ジメチルアミノエタントールのそれに比較して約20%高い。これは、S—O型でもS—N型でもHg(II)とはほとんど同程度の安定なキレート化合物を形成する、いわゆるキレート効果に基因していると考えられる。

このようにチオール化合物によるヘモグロビンHg²⁺錯体からのHg²⁺除去において、有機Hg²⁺化合物と無機Hg²⁺化合物とで幾分相異が見られることは興味深い。

第4節 Hg²⁺除去の機構

最近、トランスフェリン—Fe(III)—クエン酸錯体や血清アルブミン—Cu(II)—ヒスチジン錯体のような三重錯体の存在が示され、³⁹⁾生体内における微量金属の輸送系、特に高分子量物質と低分子量物質間の金属交換においては、生体高分子—金属—低分子錯化剤型の三重錯体の生成が、本質的な段階であるように思われる。従って、SH化合物によるヘモグロビンからのHg²⁺除去機構においても、この種の三重錯体の生成が含まれるのではないかと推定される。そこで、第2章第1節に記載した実験方法によりゲルろ過法を用いて検討した。ゲルろ過後のヘモグロビン—Hg(II)—¹⁴C—システイン三成分系の放射能溶出曲線においては、Fig. 56に示されるように¹⁴C—システインに基づく放射能は、ヘモグロビン分画に明確にあらわれている。一方、ヘモグロビンと¹⁴C—システインだけを含む二成分系においては、ヘモグロビン分画の¹⁴C—システインに基づく放射強度はほとんど無視できる。

この結果から、三重錯体すなわちヘモグロビン—Hg(II)—システイン錯体の存在が、前章における血清アルブミン—Hg(II)—システイン系と同様に確認された。それ故、種々のSH化合物によるヘモグロビン分子中のSH

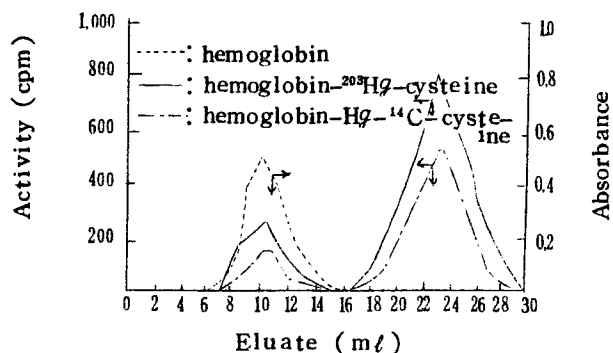
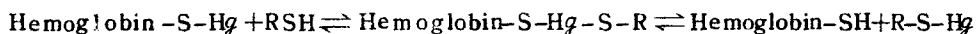


Fig. 56 Separation of ternary complex (hemoglobin-Hg-cysteine) by gel-filtration.

Concentration of mercury complex of hemoglobin: 5×10^{-4} M

Concentration of ^{14}C -cysteine: 2.5×10^{-3} M

基に結合した Hg の移動, すなわちヘモグロビンと S H キレート剤との間の Hg 交換においては, 三重錯体が中間体として重要な役割を演じていると考えられる。



ヘモグロビンから Hg は低分子キレートとして移動し, そして Hg の除去によって酸素結合能などのヘモグロビンの正常な機能は回復されるであろう。

このようなたんぱくレベルでの検討は, 金属除去に関する研究において, 臨床実験結果ならびに低分子レベルでの錯生成反応とから得られる知見に対し相補的な知見を与えるものとして重要であると考えられる。

第3章 ペニシラミンによるアルブミン Cu (II) 錯体

からの Cu 除去の機構と動力学

ウイルソン氏病は、肝臓・腎臓・脳における異常な Cu 沈着と関連した遺伝性の Cu 代謝異常である。これらの組織において発見された通常の病理学的変化は、Cu の毒性と関連している。従って、Cu の移動は、病気の過程を回復させることが期待され、実際ペニシラミンの投与による Cu の負平衡によって、神経・肝臓および腎臓障害の回復がもたらされる。正常人においては、 ^{64}Cu を経口投与もしくは静脈注射によって与えた場合、投与直後の血中の放射能は、血球と血漿の両方に存在しており、そこでは主にアルブミンに結合し、そして幾分かはアミノ酸に結合した状態で存在している。アルブミン結合 Cu は、肝臓に運ばれそこで体内を循環する前に、一部は血清たんぱく質、すなわちセルロプラスミンにとりこまれる。これに対して、ウイルソン氏病患者においては、その脳・肝臓および腎臓の Cu 濃度は非常に高いことが知られている。この場合、血漿中においてセルロプラスミンの欠乏^{19),46)}がみられるが、アルブミン結合 Cu は著しく過剰に存在している。それ故、ペニシラミンの作用様式は、*in vitro* における半透膜通過や *in vivo* における腎臓膜通過の際の効果的な拡散反応によって、血漿 Cu を減少させる能力に基づいているのではないかと推定される。しかしながら、ウイルソン氏病に対するペニシラミンの詳細な作用機序については未だ明らかにされていない。第一篇第2章において、ペニシラミンと Cu(II) との基礎的な酸化還元・錯生成反応を検討し、混合原子価キレート生成や Cu 錯体生成能と尿中 Cu 排泄効果との相関性などについて興味ある知見を得たが、本章においてはこのような基礎的結果をもとにして、さらに体内の Cu 輸送に関与し、しかもウイルソン氏病患者では著しく過剰に存在しているアルブミン結合 Cu

とペニシラミンとの相互作用を検討し、Cu 除去の機構と動力学について電子吸収スペクトル法および ^{64}Cu や ^3H -ペニシラミンを利用したゲルろ過法によって追究を行ない、ペニシラミンの生物活性とキレート生成能との関連性について詳細な考察を加えた。

第1節 電子スペクトルによるペニシラミンとアルブミンCu(II) 錯体との反応の検討

ペニシラミンとCu(II) との反応においては、還元的キレート生成反応によって赤紫色のペニシラミンCu(I, II) 混合原子価キレートおよび黄色のペニシラミンCu(I) キレートの2種が環境条件の相異によって生成したが、アルブミン結合Cu とペニシラミンとの反応においても同様の還元的キレート生成反応がおこるのかどうか、あるいはCu 移動過程における中間体としてアルブミン—Cu —ペニシラミン型の三重錯体が存在するのかなどなどの点について、電子スペクトルを中心に検討を行ない、そしてペニシラミンによるアルブミンCu(II) 錯体からのCu 移動反応の機序について考察を加えた。

実験方法

試薬：DL-ペニシラミンおよび結晶牛血清アルブミンは、Sigma社の製品を使用した。 ^{64}Cu は、日本原子力研究所製の $^{64}\text{CuCl}_2$ の水溶液で、その比放射能は178 mCi/gである。トリチウムガスとの接触法によってつくられた ^3H -ペニシラミンをシンロイヒ株式会社から入手し、その比放射能が一定(4 mCi/g)になるまでエタノール—水から再結晶して用いた。Cu(II) 標準溶液は、精秤した CuCl_2 を脱イオン水に溶解して調製し、これをEDTA 標準溶液で標定したのち使用した。緩衝溶液にはミハエリス緩衝液(1/30 M Na_2HPO_4 — 1/30 M KH_2PO_4)を用い、反応溶液のpHを中性付近(pH 6.2)に調節した。他の試薬は、すべて市販の試薬特級

品を使用した。

電子スペクトルの測定：吸収スペクトルの測定には日立自記分光光度計 E P S - 2 型を使用し、またすべての動力学的測定は島津分光光度計 Q V - 5 0 型を用い、中間錯体の吸収極大波長である $420\text{ m}\mu$ における吸光度変化を検討することによって行なった。 $5.0 \times 10^{-4}\text{ M}$ 血清アルブミン溶液に一定濃度の Cu(II) 標準溶液を加えて錯体を形成させ、ついでこれに種々の濃度のペニシラミン溶液を添加して反応させ、得られた混合溶液の吸収スペクトルを経時的に追跡した。すべての反応は、 $\text{pH } 6.2$ 、温度 $22 \pm 0.5^\circ$ の条件下で行なった。

ゲルろ過法：セファデックス G - 2 5 (乾燥重量 8 g) をミハエリス緩衝液 ($\text{pH } 6.2$) で膨潤したのち、 $2.0 \times 30\text{ cm}$ のカラムにつめる。カラムは、あらかじめ ^{64}Cu - ペニシラミンキレートおよび ^{64}Cu - 血清アルブミン錯体で放射化学的に検量した。Cu(II) イオンと血清アルブミンとの反応溶液に、さらに ^3H - ペニシラミンを作用させ、すぐにその反応混合溶液の一部をとってセファデックスカラムに流す。緩衝液 ($\text{pH } 6.2$) で溶出した各フラクションの放射能強度を測定し溶出曲線を作成した。トリチウムに基づく β 線放射能強度は、溶媒として 2 - フェニルエチルアミン - トルエンを用いることによって Beckman 液体シンチレーションカウンタ - LS - 233 型で測定した。

結果と考察

中性付近の pH において、青緑色のアルブミン Cu(II) 錯体溶液に Cu に比して小過剰濃度のペニシラミンを作用させると、瞬時にして波長 $420\text{ m}\mu$ に吸収極大を有する黄褐色錯体に変化し、これはアルブミン Cu(II) 錯体の特徴的な青緑色とは全く異なっている。この黄褐色錯体はさらに時間とともに変化し、次第に赤紫色を呈し、そして Fig. 57 に見られるように $420\text{ m}\mu$ の吸収極大は完全に消失し新たに波長 $520\text{ m}\mu$ に吸収極大を有する赤紫色錯体に移行するが、この最終的に生成する赤紫色錯体は、その配位子

場スペクトルより第一篇第2章において示したペニシラミン Cu(I, II) 混合原子価キレートと全く一致する。

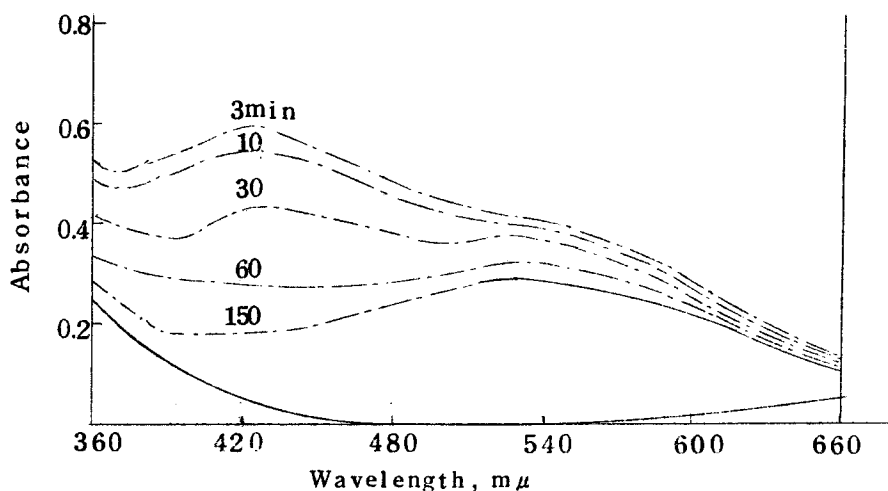


Fig. 57 Visible spectra at various times during the migration of copper from albumin-copper complex to penicillamine at pH 6.2 .

— — — — (albumin concentration : 5.0×10^{-4} M,
copper concentration : 2.0×10^{-3} M, penicillamine
concentration : 2.5×10^{-3} M)

———— (albumin concentration : 5.0×10^{-4} M,
copper concentration : 2.0×10^{-3} M)

それ故、上述の吸収スペクトル測定の結果に対するもっとも簡潔でしかも妥当な説明は、最初に生成する420 mμに吸収極大波長を有する黄褐色錯体は、三重錯体すなわち血清アルブミン、Cu そしてペニシラミン三成分が関与した錯体であり、ついでこれが解離して、ペニシラミン Cu キレートを生成するため520 mμに吸収極大が移動するという考え方であろう。

第2節 ^3H -ペニシラミン, ^{64}Cu を用いるゲルろ過法による三重錯体の証明

第1節において仮定した反応中間体としての血清アルブミン-Cu-ペニシラミン三重錯体の存在を証明するため、三成分系におけるゲルろ過法を検討した。すなわち、 $2.0 \times 10^{-3}\text{M}$ から $5.0 \times 10^{-4}\text{M}$ までの血清アルブミン溶液に $2.0 \times 10^{-3}\text{M}$ Cu(II) 溶液を加えて錯体を形成させ、ついでこれに $2.75 \times 10^{-3}\text{M}$ 濃度のペニシラミンを作用させ反応溶液をセファデックスカラムでゲルろ過を行なった。各フラクションを波長 $420\text{m}\mu$ でその吸光度を測定して溶出曲線を作成すると、高分子分画および低分子分画にそれぞれ明確なピークが観察された。そこで、三重錯体の存在を直接的に確認するため、 ^3H -ペニシラミンを用いてCu存在下でペニシラミンが血清アルブミン分画にとりこまれるかどうかを放射化学的に追究した。第1節の実験方法の項で記載した操作に従って、セファデックスG-25によってフラクション化したのち、 ^3H -ペニシラミンに基づく β 線放射能強度を液体シンチレーションカウンターで測定した。

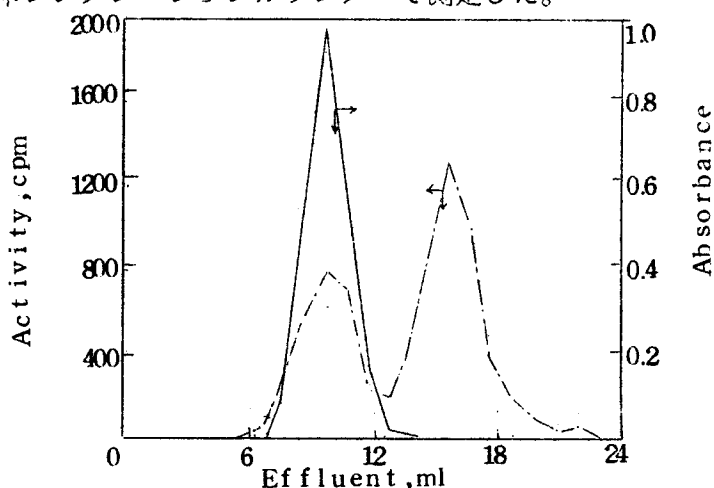


Fig. 58 Elution pattern of radioactivity of ^3H -penicillamine mixed with albumin-bound copper (— —) with a Sephadex G-25 column. The elution pattern of albumin (—) was measured spectrophotometrically at $278.5\text{m}\mu$. albumin concentration: $5.0 \times 10^{-4}\text{M}$, copper concentration: $2.0 \times 10^{-3}\text{M}$, penicillamine concentration: $2.75 \times 10^{-3}\text{M}$

その結果、Fig. 58に示すようにアルブミン分画に明確な放射能ピークが認められ、しかも高分子分画の ^3H -ペニシラミンに基づく放射能は、反応時間と共に減少することが観測された。 Cu が存在しないアルブミン-ペニシラミン二成分系における類似の実験では、アルブミン分画の ^3H -ペニシラミンに基づく放射能は極めて小さく、ほとんど無視しうるところから、血清アルブミン- Cu -ペニシラミン三成分系においては三重錯体の生成が明確に示されるであろう。

このことは、 ^{64}Cu を用いた同様の実験からも支持される。Fig. 59に示すように血清アルブミン- ^{64}Cu 二成分系においてはアルブミン： Cu(II) = 1：4のモル比で混合しても、ほとんどの Cu(II) イオンはアルブミンに結合し、解離している部分は極めて小さいと考えられる。また、ペニシラミン- ^{64}Cu 二成分系において、ほとんどすべての Cu はペニシラミン Cu キレートとして存在していると考えられる。アルブミン- ^{64}Cu -ペニシラミン系においては、高分子分画と低分子分画の二つの領域に放射能ピークが認められ、 ^3H -ペニシラミンの場合と全く同様の溶出曲線が得られた。

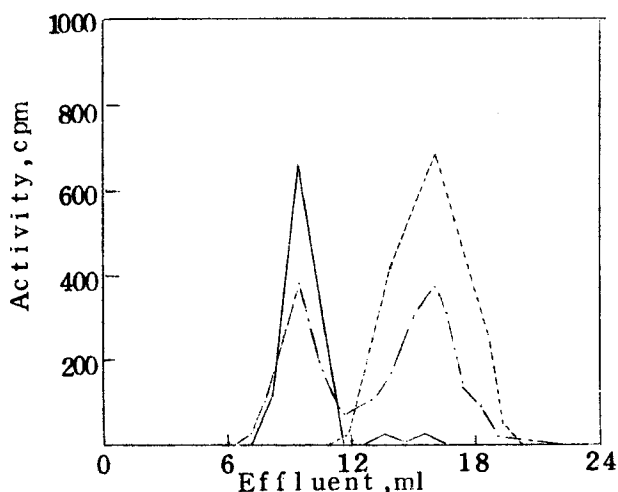


Fig. 59 Elution pattern of radioactivity of penicillamine mixed with albumin-bound ^{64}Cu (— · — · —) with a Sephadex G-25 column. The elution pattern of albumin- ^{64}Cu (—) and penicillamine- ^{64}Cu (-----) are superimposed for comparison. The concentrations of reagents are the same as those in the case of Fig. 2.

これらの事実から、血清アルブミン—Cu—ペニシラミン型の三重錯体の生成が明確に示され、そしてこの種の錯体は、ペニシラミンによるCu除去過程における中間体として重要な役割を演じていると考えられる。また、 ^3H -ペニシラミンを用いた場合の溶出曲線と ^{64}Cu を用いた場合の溶出曲線とがほとんど同じようなパターンを示していることから考えて、本三重錯体においてCuイオンは、高分子と低分子との間のブリッジとしての役割をはたしている⁴⁷⁾と推定される。Klotz⁴⁷⁾らが、金属イオンはたんぱく質への低分子化合物の結合を媒介するという考え方を提案して以来、この仮説は、酵素の作用機構を説明するのに用いられてきたが、最近Mildvanらは、フルオロキナーゼ系において酵素結合金属と基質との間の橋状構造をMn(II)のような常磁性イオンが水のプロトン緩和速度やフッ素核の緩和速度におよぼす効果は、形成される金属錯体の種類に非常に鋭敏であることを巧みに利用してNMR的に証明した。⁴⁸⁾血清アルブミン—Cu—ペニシラミン系においても、Cuイオンはペニシラミンのアルブミンへの直接の結合を容易にさせるためたんぱく質に構造変化を誘起させる役割をはたしている⁴⁸⁾と考えるよりも、アルブミンとペニシラミンの両方に結合してブリッジとして作用している⁴⁸⁾と考える方が妥当であると考えられる。

第3節 吸収スペクトル法によるCu除去に関する動力学的検討

血清アルブミン—Cu—ペニシラミン三重錯体からペニシラミンCu(I, II)キレートへ解離する過程の反応動力学について検討を行なった。すなわち、三重錯体の吸収極大波長である $420\text{m}\mu$ における吸光度の変化を経時的に追跡したところ、本解離反応は見掛け上一次反応に従って進行することが認められた。そこで、ペニシラミン濃度およびアルブミン濃度の関数として、見掛けの速度定数をpH 6.2で測定した。Fig. 60は、血清アルブミンCu(II)錯体の濃度を一定にした条件下で得られた速度定数と種々

のペニシラミン濃度との間の関係を示したものである。血清アルブミン：Cu(II) とのモル混合比が 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 および 1 : 4 において、それぞれ直線的な相関性が観察される。従って、一般的に速度式は、次のようにあらわせるであろう。

$$K_{\text{obs.}} = K' \cdot [\text{Penicillamine}] \quad (1)$$

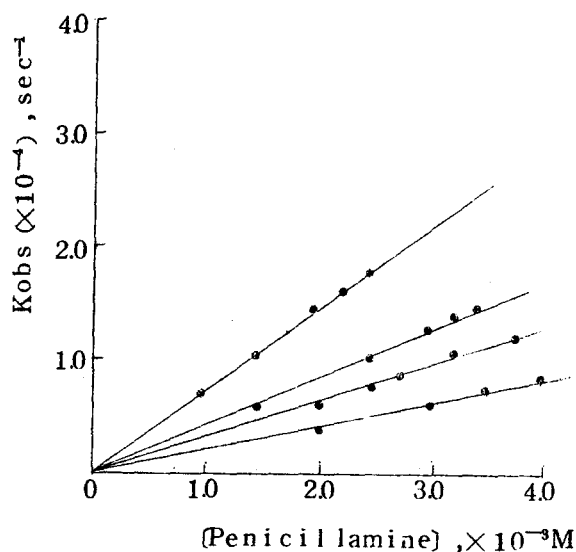


Fig. 60 Initial rate of the removal of copper from albumin-copper complex as a function of penicillamine concentrations.

I. Albumin : Cu(II) = 1 : 1

II. Albumin : Cu(II) = 1 : 2

III. Albumin : Cu(II) = 1 : 3

IV. Albumin : Cu(II) = 1 : 4

albumin concentration : 5.0×10^{-4} M

同様に、ペニシラミン濃度一定条件下での速度定数とアルブミン濃度の逆数との間にも、Fig. 61に見られるように直線的な相関性が認められ、速度式は次のように表わせる。

$$K_{\text{obs.}} = K'' \cdot \frac{1}{[\text{Albumin}]} \quad (2)$$

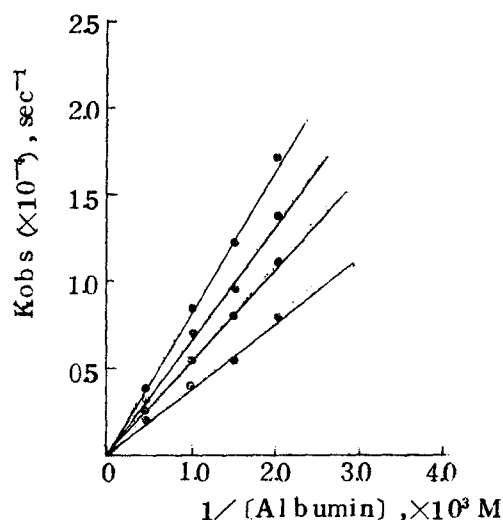


Fig. 61 Initial rate of the removal of copper from albumin-copper complex as a function of albumin concentrations.

- I. penicillamine concentration : 1.0×10^{-3}
- II. penicillamine concentration : 1.5×10^{-3}
- III. penicillamine concentration : 2.0×10^{-3}
- IV. penicillamine concentration : 2.5×10^{-3}

さらに、Fig. 60において各直線の勾配から算出した K' の値とアルブミン濃度との間の相関性およびFig. 61の各直線の勾配から得た K'' の値とペニシラミン濃度との間の相関性を検討してみると、それぞれFig. 62およびFig. 63に示すような直線関係が観察された。

このことは、 K' および K'' が次式によって書きかえることができることを示している。

$$K' = K \cdot \frac{1}{[\text{Albumin}]} \quad (3)$$

$$\text{但し, } K = 3.84 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1} \text{ M}^{-2}$$

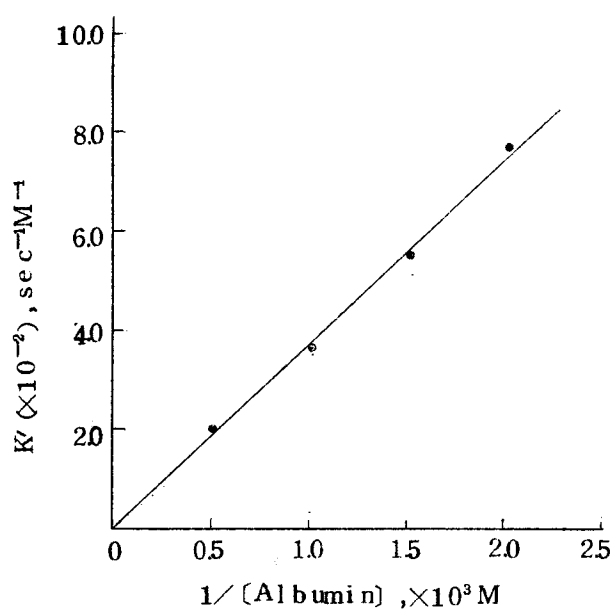


Fig. 62 Dependence of the rate constants K' on the albumin concentration.

The rate constant calculated from the slope is $3.84 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1} \text{ M}^{-2}$.

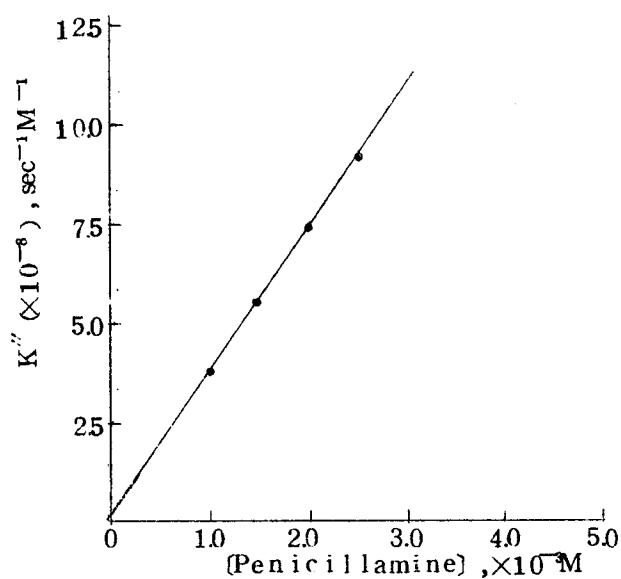


Fig. 63 Dependence of the rate constants K'' on the penicillamine concentration.

The rate constant calculated from the slope is $3.75 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1} \text{ M}^{-2}$.

また,

$$K'' = K \cdot [\text{Penicillamine}] \quad \text{..... (4)}$$

$$\text{但し, } K = 3.75 \times 10^{-5} \text{ sec.}^{-1} \text{ M}^{-2}$$

(3)式および(4)式から算出されたKの値は, よく一致していると考えられる。それ故, 血清アルブミン—Cu—ペニシラミン三重錯体が解離して, ペニシラミンCu(I, II) キレートに移行する反応の速度は, 次式に示すようにペニシラミン濃度に比例し, またアルブミン濃度に逆比例することがわかった。

$$\begin{aligned} \text{rate} &= \frac{-[\text{Albumin—Cu—Penicillamine}]}{dt} \\ &= K \cdot [\text{Penicillamine}] \cdot \frac{1}{[\text{Albumin}]} \quad \text{..... (5)} \end{aligned}$$

$$\text{但し, } K = 3.8 \times 10^{-5} \text{ sec.}^{-1} \text{ M}^{-2}$$

第4節 Cu 除去の機構

前述の検討の結果から, ペニシラミンによるアルブミンCu(II)錯体からのCu移動の機構に対して, 次のような反応schemeが考えられる。

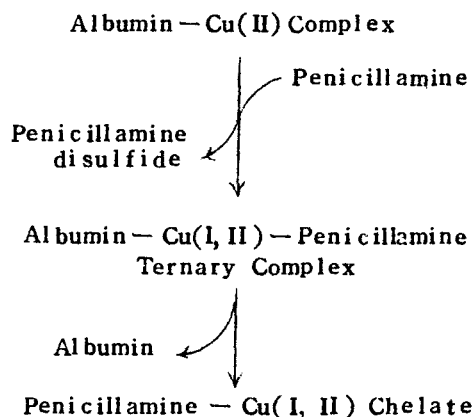


Fig. 64 Probable reaction scheme for the migration of copper from albumin-copper complex to penicillamine via a ternary complex.

すなわち、アルブミンCu(II) 錯体にペニシラミンを作用させるとただちに還元的キレート生成反応によって、波長 $420\text{ m}\mu$ に吸収極大を有する三重錯体が形成される。この段階において、すでに酸化還元反応がおこっていることは、三重錯体の配位子場スペクトルが $420\text{ m}\mu$ (23810 cm^{-1})に吸収を示し、しかも通常の一価銅錯体や二価銅錯体に比較して分子吸光係数が相当大きいこと、また Cu^+ に対する特異的試薬であるクプロインの添加によって、明らかに Cu^+ の存在を確認できることから推定される。さらに酸化還元反応における電子移動は、錯体イオンの再編成よりも速やかに⁴⁹⁾おこるというFrank — Condonの原理からも支持されるであろう。ついで、この三重錯体が見掛け上一次反応に従って解離し、ペニシラミンCu(I, II)混合原子価キレートが生成し、そしてこの反応においては、三重錯体の解離が律速段階である。トランスフェリンとキレート剤との間のFe(III)交換反応においても、ポリマー錯体が関与しない場合には三重錯体の解離が³⁹⁾律速段階であることが観測されている。さらに、Cuイオンを含む酸化酵素の多くはCu(I) — Cu(II)の相互作用をもつであろうというSigwartら⁵⁰⁾の指摘を考え合わせると、上述のような三重錯体の生成は、金属イオンの体内輸送の面からだけでなく酵素活性の面からも興味ある問題を含んでいると考えられる。

以上は、ペニシラミンがアルブミンCu(II) 錯体に対して同濃度もしくは小過剰濃度で処理された場合の反応であるが、大過剰のペニシラミンの存在下では上述の反応とは幾分異なっている。すなわち、この条件下での血清アルブミン—Cu—ペニシラミン三成分系の反応溶液はうすい黄色を呈し、その吸収スペクトルは可視部領域ではわずかにtailを示すのみで、これはペニシラミンCu(I)キレートの吸収スペクトルと一致する。また、⁶⁴Cuを用いたゲルろ過法によってもFig. 65に見られるように本条件下では、ほとんどすべてのCuがペニシラミンCu(I)キレートとして存在しているであろう。従って、ペニシラミン大過剰の条件下では、現在の方法によっ

ては中間体としての三重錯体の存在は認められず、幾分異なった反応機構によって進行することが推定されるが、この条件下においても還元的キレート生成反応によって、水溶性の高い、安定なペニシラミンCu(I)キレートが生成され、そして除去されてくることが確認された。

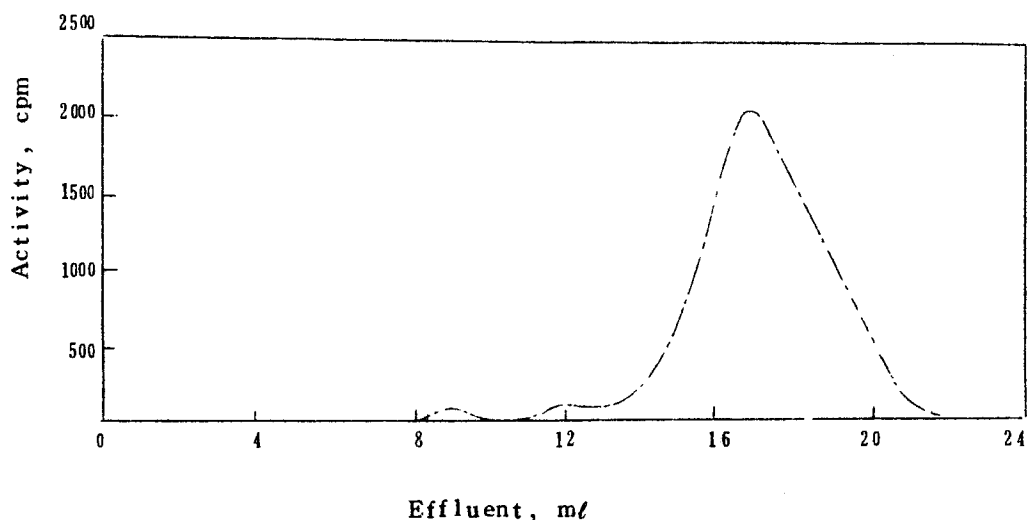


Fig. 65 Elution pattern of radioactivity of large excess penicillamine mixed with albumin-bound $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ with a Sephadex G-25 column.

albumin concentration : $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$
copper concentration : $2.0 \times 10^{-3} \text{ M}$
penicillamine concentration : $6.6 \times 10^{-2} \text{ M}$

第一篇第2章でのペニシラミンとCu(II)との詳細な酸化還元・錯生成反応の検討から、ペニシラミンによるCuの移動性は、Cu(II)に対するそのキレート生成能と酸化還元能との間の微妙なバランスによっていることを指摘した。さらに本章において、たんぱく質に非特異的に結合したCu(II)イオン、とりわけウイルソン氏病との関連が極めて深いアルブミンCu(II)錯体とペニシラミンとの相互作用の検討より、還元的キレート生成反応が

Cu 移動に対して重要な役割をはたしていることを明確に示した。また、⁵¹Peisachらも最近、電子スピン共鳴吸収法 (E S R) によって、Cu(II) イオンがペニシラミンによって還元され、そしてペニシラミン自身は酸化される現象を観察し、ウイルソン氏病に対するペニシラミンの有効性には、この種の酸化還元反応が関与していることを暗示している。ウイルソン氏病治療におけるペニシラミンの作用様式は、その Cu に対する還元的キレート生成能に大きく基因していることが強く考えられる。

第4章 錯体化学を基礎とした新しい重金属解毒剤・

放射性核種除去剤の開発に関する考察

重金属や放射性核種が生体内に侵入した場合の医学的処置の目的は、有害金属によって引き起こされる重大な障害が発生しないように阻止すること、もしそれが起こった場合に取り除くことおよび軽減することなどであろう。有害金属の体内摂取直後では、まず最初に血中への吸収を防止するようにしなければならない。放射性核種の場合には、その放射線の照射が有害な影響をおよぼすのであるから、処置の目的は何よりも体外排泄の促進である。血流中に吸収された金属や体組織に沈着した金属を除去するもっとも有効かつ直接的な方法は、キレート剤の投与である。一般に、生体から有害金属を除去するためのキレート剤の選択に関する物理化学的研究においては、その有害金属の物理化学的性質、キレート剤の特定なドナー元素との選択的反応性、キレート剤—有害金属錯体の安定性あるいはアルブミン、核酸などの生体内配位子との競合反応などが問題となる。特に、キレート剤が実際に有害金属の解毒除去に用いられるためには、次のような条件を備えていることが必要である。

- a) 生体内に広く分布し、対象金属と安定なキレート化合物を生成すること。
- b) 生体構成成分とくにCaとの結合が小さいこと。
- c) 生体内でキレート生成反応を妨害する他の化学反応がないこと。
- d) キレート剤自身が生体内で分解されず、また生成キレートが排泄され易いこと。
- e) 毒性が低く、経口投与でも体内吸収がよいこと。

生体内には種々のキレート生成能をもった物質、たとえばたんぱく質やアミノ酸が存在するため、これらと競合して対象金属と十分安定なキレート化合

物を生成する，すなわち生成定数の高いキレート物を生成することは，必要最小限の条件である。しかし，いかに強力なキレート剤でも生体内で対象金属と接することができなければ効果がなく，従って金属の生体分布とキレート剤の細胞膜透過性が問題となる。また，体液中には多量の Ca が存在するため，これとの高い親和性は，pH 調節などの生理機能をそこなうおそれがある。溶液中で物理化学的に測定された生成定数が十分大であっても対象金属が生体組織中の pH において，水酸化物やコロイド状で存在すると正常なキレート生成反応は妨害され，キレート剤はその効力を十分発揮できない。⁵²⁾さらに生成したキレート化合物は，すみやかに体外に排泄されることが望ましく，従ってキレート化合物の腎臓通過性が問題となる。腎臓通過性には多くの要因が考えられるけれども，少なくとも生成キレートが低分子で水溶性かつ拡散性であることが要求される。キレート剤が代謝され難いことや一般的毒性が低いこと，さらに薬剤としての安定性が高く，経口投与も可能であることなどは，他の種類の薬物の場合と同様である。

このような条件をすべて満足させるようなキレート剤はないが，Hg や Pb などの重金属の除去に対しては，ペニシラミンがこれらの条件を多く備えていると考えられる。すなわち，ペニシラミンは，Hg ， Pb ， Cd ， Sn などの重金属類と極めて安定なキレート物を生成するが，一方，Ca などのアルカリ土類金属に対する親和性は非常に小さい。これは，重金属類に対してドナー原子として強く結合するのは酸素よりもイオウまたは窒素であるが，Ca は酸素を好むことに基因している。また，ペニシラミンは，システイン基本骨格においてそのβ炭素原子に2個のメチル基が置換された構造を有し，生体内分解反応とくにアミノ酸酸化酵素の作用を受けにくいなど，代謝され難いことが知られている。ただ，光学活性体のうちL-ペニシラミンは，生体内で酵素反応を受けてピリドキサル-5-リン酸とただちに反応してチアゾリジン環を形成し，¹⁴⁾またウラシル，グアニンとの共重合体およびウラシル，グアニン，アデニンとの共重合体を通してポリペプチドにとりこまれるなど⁵³⁾

の生体反応を受けるため、そのキレート生成反応が妨害され、解毒効果は低い。さらにペニシラミンは、Hg²⁺、Pb²⁺、Cd²⁺などの重金属とはもちろんのことCuとも還元的キレート生成反応によって、水溶性・拡散性の安定な低分子ペニシラミンキレートを形成するため、その生成キレートは排泄され易いと考えられる。ペニシラミンは、他のキレート剤に比較して大量投与してもはるかに副作用は少なく、かつ経口投与の形でも静脈注射や筋肉注射で与えた場合と効果がかわらない。¹⁸⁾これらの諸性質は、重金属類の解毒剤として使用する上で、非常に実用的かつ優れた性質である。今後、ペニシラミンには、さらに種々の有害金属の解毒剤としての利用が期待される。しかし、一方ペニシラミンを投与した際の金属の生体内での輸送、移動、分布などの全貌がまだ明らかにされていないので、ペニシラミンがある種の金属の排泄を促進させることはたしかであるが、一方金属をある臓器や組織に濃縮するような作用をもつ可能性も考えられ、これらのことは今後の研究課題と考えられる。

このように錯体化学の立場から有害金属の解毒除去に対するキレート剤を選択、開発する場合には、キレート剤自身の安定性、生成キレート化合物の物理化学的性質、生体内配位子との相互作用あるいはキレート剤および生成キレート化合物の生体内挙動などが問題となり、そしてこのような種々の物理化学的諸因子を詳細に検討・考察することによって、有害重金属に対するペニシラミンの有用性を論じてきた。現在、ペニシラミンのほかに、Hg中毒に対してN-アセチルペニシラミンおよび α -メルカプトプロピオニルグリシンが実際に使用されたという報告例がみられるが、さらに有害金属の解毒除去剤の開発に対して錯体化学的見地から考察すれば、まず疎水性の基を導入することによって化合物に親リポイド性を増せばキレート剤の生体内分布に変化が期待される。このような例として、たとえばPenicillamine methyl esterが考えられる。そしてこの種の研究は、特定組織へ選択的に分布する化合物の開発に対して有用な知見を与えるであろう。また、セレン原子によ

るイオウ原子の置換は有機 Hg の除去において有利であることを考えれば、イオウをセレンに置換した化合物に興味をもたれる。一般に、セレン元素の毒性は極めて強いが、Selenopenicillamine のような一種のアミノ酸型の化合物にすればその毒性は非常に減ずるのではないかと推定される。さらに S H 基を含むペプチド類は、重金属類に対して非常に強いキレート生成能を有することが予想され、しかもその分子内ペプチド結合によって化合物としての毒性をさらに減少させることが期待される。このような観点から、たとえば Penicillaminyl glycine のような化合物が考えられる。

もとよりキレート剤による重金属解毒作用には種々の要因が複雑にからみ合っており、金属キレーションからだけではその全貌を明らかにすることは困難であり、また重金属解毒剤としてのキレート剤の応用に関する最終的評価は、臨床実験の結果をまたねばならないけれども、キレート生成能との関連性が明確な重金属解毒作用においては、錯体化学の立場から新しい優れた解毒剤を系統的に追究する方向は極めて有用であり、また薬学領域においては、興味ある重要な課題であると考えられる。

結 論

1. 分子中に S H 基, NH_2 基および COOH 基三種の官能基を有するペニシラミンの酸解離平衡および種々の金属イオンとのキレート生成反応を電位差滴定, 電子吸収スペクトルおよび N M R 法によって詳細に検討した。ペニシラミンをはじめ N - アセチルペニシラミンおよびペニシラミンメチルエステルの各金属キレートの生成定数を Bjerrum の方法によって算出し, これらキレート化合物の生成定数の比較検討からペニシラミンは, Co(II) , Ni(II) および Zn(II) に対してはそのチオール基とアミノ基とで配位した 2 : 1 のキレートを生成し, 一方, Cd(II) , Hg(II) および Pb(II) に対してはチオール基とアミノ基の他に, さらにカルボキシル基が関与した 1 : 1 のキレートを生成することを示した。
2. 種々のモデル化合物において, キレートの配位の形式と吸収極大波長との関連性を検討し, ペニシラミン Ni(II) キレートは S - N 型の配位を, そしてペニシラミン Pb(II) キレートは S - N - O 型の配位を好むことを明らかにした。また, チオール基含有キレート剤の Pb(II) キレートの吸収極大波長とその生成定数との間にはよい相関性が認められ, 安定度の高いキレートほど短波長に吸収をもつことを観察した。
3. 水溶液中におけるペニシラミンおよびペニシラミン金属キレートの N M R スペクトルを測定し, ペニシラミン分子中のカルボキシル基からの配位の強さは, $\text{Pb(II)} > \text{Hg(II)} > \text{Cd(II)}$ の順に減少することを pH 2 ~ 3 の領域におけるメチンプロトンの化学シフトの大きさから示した。そして, 重金属解毒効果が大きい Hg(II) , Pb(II) , Sn(II) , Cd(II) などの原子番号の大きい金属イオンに対しては, ペニシラミンは三座配位子として作用することを観察した。
4. ペニシラミンと Cu(II) との反応を電子スペクトルおよび電位差滴定法

によって追究し、環境条件によって赤紫色のペニシラミン Cu(I, II) 混合原子価キレートと黄色のペニシラミン Cu(I) キレートとが生成することを認め、その還元的キレート生成反応に対する反応機構を考察した。また、水溶液中から上記二種のキレート化合物を単離し、その構造を推定した。

5. ペニシラミン関連化合物と Cu(II) との酸化還元・錯生成反応においては、システイン基本骨格における β 位炭素原子の置換基が大きな影響をおよぼすこと、そしてペニシラミンや β -メチル- β -エチルシステインのように尿中 Cu 排泄効果を示す化合物は、水溶性の安定な混合原子価キレートを形成するのに対し、システインや N-アセチルペニシラミンのような尿中 Cu 排泄効果のない化合物では、安定な混合原子価キレートを生成しないことを観察した。
6. チオグリコール酸、N-アセチルペニシラミン、グルタチオン、2-メルカプトエチルアミン、 α -メルカプトプロピオニルグリシンおよびペニシラミンメチルエステルのような S H 基含有化合物とペニシラミンとが共に関与した混合配位子 Pb(II), Hg(II) および Cd(II) キレートの生成を電位差滴定法によって明らかにし、その生成定数を算出した。混合配位子キレートの生成定数と secondary ligand としてのチオール化合物の S H 基の解離定数との間に直線的な相関性が認められた。また、混合配位子キレートの生成定数の相対的な順序は、Cd(II) > Hg(II) > Pb(II) であるが、これは primary chelate であるペニシラミン金属キレートにおけるカルボキシル基からの配位の強さの順序と逆である。
7. ペニシラミンキレートの安定度の順序は、Hg(II) > Pb(II) > Cd(II) \approx Ni(II) > Zn(II) > Co(II) である。従って、 ^{60}Co を放射性指示薬として Hg(II), Pb(II), Cd(II) などの有害重金属類の放射滴定法が期待される。生成キレートと遊離金属イオンとを陽イオン交換樹脂によって分離し、溶出液の放射能強度と添加ペニシラミン量とから滴定曲線を作成するこ

とによって、 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ M程度の $Hg(II)$ 、 $Pb(II)$ 、 $Cd(II)$ および $Ni(II)$ の放射滴定が可能であった。また本法は、phenylmercuric chloride, ethylmercuric chloride あるいは phenylmercuric acetate などの有機 Hg 化合物の定量に対しても極めて有用であった。さらに、本放射滴定法の定量限界に対する理論的考察を行った。

8. ペニシラミンをキレート剤とする塩化フェニル水銀および塩化第二水銀の準化学量論的同位体希釈分析について検討し、展開溶媒としてイソプロピルアルコール：濃アンモニア：水＝7：1：2系を用いるペーパークロマトグラフィーによって、 10^{-6} g 程度の水銀化合物を容易に定量できることを示した。
9. たんぱく結合金属とキレート剤との相互作用を平衡透析法によって追究を行なった。その結果、ペニシラミンやN-アセチルペニシラミンのようなSH基を含むキレート剤は、たんぱく質中のチオール基に強く結合している $Hg(II)$ の除去に対して著しい効果を示し、他方 $Zn(II)$ 除去の場合にはEDTAやDTPAが、SHキレート剤よりもはるかに効果的であることがわかった。そして $Zn(II)$ キレートの生成定数とたんぱく質からの $Zn(II)$ 除去率との間にはよい相関性が認められ、 $Zn(II)$ の除去はもっぱらキレート剤と $Zn(II)$ との結合能に依存していることを示唆している。また、 $Cd(II)$ の除去率は、SHキレート剤とアミノポリカルボン酸類とでのおおの別個にそのキレートの生成定数と関連していた。検討されたたんぱく質において、金属除去の容易さの順序は、キレート剤の種類にかかわらず、ミオグロビン>血清アルブミン \geq ヘモグロビンであった。
10. SH基を含む種々のキレート剤によるヘモグロビン結合 Hg の除去反応について詳細な検討を行ない、エチル Hg の除去率とキレート剤のSH基の解離定数との間には直線的な関係が存在することを認めた。しかもイオウ—酸素配位型のキレート剤の効果は、イオウ—窒素配位型のキレ

ート剤の効果よりも約20%大きかった。他方、無機Hgの除去率は、キレート剤の酸解離定数とは無関係であった。配位原子の同族置換の影響をセレノシステアミン、システアミンおよびエタノールアミンについて検討し、とくに有機Hg化合物の除去に対しては、セレン原子によるイオウ原子の置換が有用であることを明らかにした。さらに、Hg除去過程における重要な中間体と考えられるたんぱく質—金属—キレート剤型の三重錯体をゲルろ過法によって確認した。

- 1.1. 血清アルブミンCu(II)錯体は、ウイルソン氏病患者において著しく過剰に存在しているので、ペニシラミンによるアルブミンCu(II)錯体からのCu移動の機構と動力学とを検討した。ペニシラミン小過剰の条件下では、アルブミンCu(II)錯体とペニシラミンとは還元的キレート生成反応を起こしてアルブミン—Cu(I, II)—ペニシラミン三重錯体を形成し、ついでこれが解離してペニシラミンCu(I, II)混合原子価キレートを生成する機構が考えられた。中間体としての三重錯体の生成は、 ^3H -ペニシラミンおよび ^{64}Cu を用いるゲルろ過法によって直接的に証明した。そして本三重錯体の解離反応の速度は、ペニシラミン濃度に比例し、アルブミン濃度に逆比例すること、またペニシラミンによるCu移動反応の律速段階は、三重錯体の解離であることを示した。ペニシラミン大過剰の条件下では、ペニシラミンCu(I)キレートとして移動することを認めた。従って、ウイルソン氏病に対するペニシラミンの作用機序には、Cuに対するペニシラミンの還元的キレート生成能が大きく関与していることが推定された。
- 1.2. 以上の諸点より、ペニシラミンの重金属解毒作用とそのキレート生成能との間の関連性について追究し、ペニシラミンの優秀性を明らかにすると共に、錯体化学の立場から新しい可能性ある重金属解毒剤の探究に対して考察を行なった。

謝 辞

終わりにのぞみ、本研究の実施にあたり終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜った田中 久教授に謹んで感謝の意を表する。有益な御助言を与えられた横山陽助教授ならびに放射性薬品化学教室の各位に感謝する。さらに、元素分析を担当された京都大学元素分析センターの諸氏、NMRスペクトルを測定された新宮徹朗博士ならびに実験に協力された藤原 聖氏、関 啓子氏、阪口喜美子氏、北条康司氏に感謝する。

文 献

- 1) E.P.Abraham, E.Chain, W. Baker and P. Robinson, Nature, 151, 107(1943).
- 2) Merck & Co., Inc., Brit. Patent 622298(1949) [C.A., 43, 7039(1949)].
- 3) H.M.Crooks, "The Chemistry of Penicillin," ed. by H. T. Clarke, J. R. Johnson and R. Robinson, Princeton University Press, Princeton, 1949, pp. 455—472.
- 4) K. Savard, E.M. Richardson and G. A. Grant, Can. J. Research, 24B, 28 (1946).
- 5) D.M.G. Armstrong, Chem. Ind. (London), 1955, 1405.
- 6) A. Albert and E.P. Serjeant, " Ionization Constants of Acids and Bases, " Methuen, London, 1962.
- 7) D.P. Wrathall, R.M. Izatt and J. J. Christensen, J. Am. Chem. Soc., 86, 4779(1964).
- 8) L.F. Maley and D. P. Mellor, Nature, 165, 453 (1950).
- 9) J. Bjerrum, "Metal Ammine Formation in Aqueous Solution," P. Haase and Sons, Copenhagen, 1941.
- 10) S. Chaberek and A. E. Martell, J. Am. Chem. Soc., 74, 5052 (1952).
- 11) D.A. Doornbos and J. S. Faber, Pharm. Weekblad, 99, 289 (1964).
- 12) N. C. Li, O. Grawron and G. Bascuas, J. Am. Chem. Soc., 76, 225 (1954)
- 13) H. V. Aposhian, Federation Proc., 20, 185 (1961).
- 14) a) E. J. Kuchinskas, A. Horvath and V. Vigneaud, Arch. Biochem. Biophys., 68, 69 (1957); b) P. Holzt and D. Plam, Pharmacol.

- Rev., 16, 113 (1964).
- 15) a) K. Yamasaki and K. Sone, *Nature*, 166, 998 (1950); b) R. L. Belford, A. E. Martell and M. Calvin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 2, 11 (1956).
- 16) C. J. Ballhausen, "Introduction to Ligand Field Theory," McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 1962.
- 17) R. J. Day and C. N. Reilley, *Anal. Chem.*, 36, 1073 (1964).
- 18) B. Pommey, *Therapie*, 22, 739 (1967).
- 19) a) J. M. Walshe, *Am. J. Med.*, 21, 487 (1956); b) I. H. Scheinberg and I. Sternlieb, *Pharmacol. Rev.*, 12, 355 (1960); c) R. A. Peters and J. M. Walshe, *Proc. Roy. Soc.*, 166, 273 (1966).
- 20) a) N. P. Goldstein, R. V. Randall, J. B. Grass, J. W. Rosevear and W. F. McGuckin, *Neurology (Minneapolis)*, 12, 231 (1962); b) B. S. Hartley and J. M. Walshe, *Lancet*, ii, 434 (1963); c) I. H. Scheinberg, *J. Chron. Dis.*, 1964, 293; d) J. M. Walshe, *Clin. Sci.*, 26, 401 (1964).
- 21) P. Day and D. W. Smith, *J. Chem. Soc. (A)*, 1967, 1045.
- 22) I. M. Klotz and G. H. Czerlinski, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 2920 (1958).
- 23) P. Hemmerich, "The Biochemistry of Copper," ed. by J. Peisach, P. Aisen and W. Blumberg, Academic Press, Inc., New York, 1966, pp. 15-34.
- 24) H. V. Aposhian, "Metal-Binding in Medicine," ed. by M. J. Seven, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1960, pp. 290 - 295.
- 25) P. Z. Newmann and M. Silverberg, *Nature*, 210, 416 (1966).
- 26) a) A. S. Mildvan and M. Cohn, *J. Biol. Chem.*, 241, 1178 (1966);

- b) A. K. Babko, *Talanta*, 15, 721 (1968).
- 27) G.H. Carey, R. F. Boguchi and A. E. Martell, *Inorg. Chem.*, 3, 1288 (1964).
- 28) L. C. Thompson and J. A. Loraas, *Inorg. Chem.*, 2, 89 (1963).
- 29) M. B. Chenoweth, *Clin. Pharmacol. Therap.*, 9, 365 (1968).
- 30) J. L. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.*, 46, 1510 (1924).
- 31) a) T. Braun and J. Tolgyessy, *Talanta*, 11, 1277 (1964); b) J. Konecny and J. Tolgyessy, *Radioisotopy*, 7, 87 (1966).
- 32) a) J. Ruzicka and J. Stary, *Atom. Energy Rev.*, 2, 3 (1964);
b) J. Prasilova, *Talanta*, 13, 1567 (1966); c) G. B. Briscoe, B. G. Cookey, J. Ruzicka and M. Williams, *Talanta*, 14, 1457 (1967); d) J. W. McMillan, *Analyst*, 92, 539 (1967).
- 33) A. N. Nesmejanow, *Ber.*, 62, 1010 (1929).
- 34) G. E. Francis and J. D. Hawkins, *Intern. J. Appl. Rad. Isotopes*, 18, 223 (1967).
- 35) G. R. Tristram, "The Proteins," Vol. I., Part A, Academic Press, Inc., New York, 1953, p. 181.
- 36) L. G. Sillen and A. E. Martell, "Stability Constants of Metal-Ion Complexes," The Chemical Society, London, 1964.
- 37) a) D. J. Perkins, *Biochem. J.*, 80, 668 (1961); b) W. U. Malik and M. V. Singh, *J. Indian Chem. Soc.*, 46, 618 (1969).
- 38) P. S. Shetty and Q. Fernando, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 29, 1921 (1967).
- 39) a) G. W. Bates, C. Billups and P. Saltman, *J. Biol. Chem.*, 242, 2816 (1967); b) B. Sarkar and Y. Wigfield, *Can. J. Biochem.*, 46, 601 (1968).
- 40) a) R. W. Ellis and S. C. Fang, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 11, 104

- (1967); b) Y. Takeda, T. Kunugi, O. Hoshino and T. Ukita, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 13, 165 (1968); c) K. Östlund, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 27, 1 (1969).
- 41) a) B. Sapiro, *J. Nucl. Med.*, 9, 347 (1968); b) A. Cardinale and G. F. De Simone, *J. Nucl. Biol. Med.*, 12, 121 (1969).
- 42) a) A. Riggs, *J. Gen. Physiol.*, 36, 1 (1952); b) V. M. Ingram, *J. Biochem.*, 59, 653 (1955); c) R. E. Benesh, A. Lardy and R. Benesh, *J. Biol. Chem.*, 216, 663 (1955); d) M. F. Perutz, *J. Mol. Biol.*, 13, 646 (1965); e) T. R. Stengle and J. D. Baldeschwieler, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 3045 (1967); f) H. R. Marti, *Experimentia*, 25, 468 (1969).
- 43) L. Pichat, M. Herbert and M. Thiers, *Tetrahedron*, 12, 1 (1961).
- 44) J. Schubert, E. R. Russel and L. S. Myers, *J. Biol. Chem.*, 185, 387 (1950).
- 45) A. Yokoyama, H. Sakurai and H. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1021 (1970).
- 46) a) J. M. Walshe, "The Biochemistry of Copper," ed. by J. Peisach, P. Aisen and W. E. Blumberg, Academic Press, Inc., New York, 1966, p. 475; b) S. B. Osborn and J. M. Walshe, *Lancet*, i, 344 (1967); c) A. J. Levi and H. S. Williams, *Clin. Sci.*, 34, 379 (1968); d) J. M. Walshe, *Lancet*, i, 775 (1968).
- 47) I. M. Klotz and W. C. Ming, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 805 (1954).
- 48) a) A. S. Mildvan, J. S. Leigh and M. Cohn, *Biochemistry*, 6, 1805 (1967); b) A. S. Mildvan and M. C. Scrutton, *Biochemistry*, 6, 2978 (1967).
- 49) B. J. Zwolinski, R. J. Marcus and H. Eyring, *Chem. Rev.*, 55, 157 (1955).

- 50) C. Sigwart, P. Hemmerich and J. T. Spence, *Inorg. Chem.*, 7, 2545 (1968).
- 51) J. Peisach and W. E. Blumberg, *Mol. Pharmacol.*, 5, 200 (1969).
- 52) A. Catsch, *Health Phys.*, 8, 725 (1962).
- 53) A. Wacker, *Arznei. Forsch.*, 16, 825 (1966).